Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik – Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Auswirkungen von Zinkoxid-Nanopartikeln in Kombination mit Bestrahlung auf das Überleben von menschlichen Tumorzellen und Fibroblasten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Katharina Messerschmid
aus Gräfelfing

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

TABELLENVERZEICHNIS VI

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VII

1 EINLEITUNG UND ZIELE DER DISSERTATION 1

2 LITERATURDISKUSSION 3

2.1 Tumore des Kopf- und Halsbereichs 3

2.1.1 Molekulare Pathogenese von HNSCC 5

2.1.2 Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich 10

2.2 Zinkoxid-Nanopartikel 15

2.2.1 Anwendungen und Wirkmechanismen von ZnO NP 20

2.2.2 Zytotoxizität von ZnO NP auf humane Zellen und selektive Toxizität 24

2.2.3 Verwendungsmöglichkeiten von ZnO NP in der Tumortherapie 27

3 MATERIAL UND METHODEN 34

3.1 Material 34

3.1.1 Zellen und Zelllinien 34

3.1.2 Zinkoxid-Nanopartikel 34

3.1.3 Chemikalien 35

3.1.4 Lösungen und Zellkulturmedien 37

3.1.5 Verbrauchsmaterialien 37

3.1.6 Geräte 39

3.1.7 Software 41

3.2 Methoden 42

3.2.1 Zellkultur 42

3.2.1.1 Zellzählung 43

3.2.1.2 Kryokonservierung der Zellen 43

3.2.1.3 Isolierung der primären Fibroblasten 43

3.2.2 Zinkoxid-Nanopartikel 44

3.2.2.1 Aliquotierung der Zinkoxid-Nanopartikel 44

3.2.2.2 Behandlung von Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln 45
3.2.3 Behandlung der Zellen mit ZnO NP und Bestrahlung und anschließendes Koloniebildungsassay 46
3.2.3.1 Aussaat der Zellen für die Behandlung 46
3.2.3.2 Behandlung der Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln 47
3.2.3.3 Ernten der Zellen 47
3.2.3.4 Zählen der Zellen mit CASY® Cell Counter & Analyzer 47
3.2.3.5 Einstellen der geeigneten Zellzahlen für das Koloniebildungsassay 47
3.2.3.6 Bestrahlung der Zellen 48
3.2.3.7 Aussaat in Zellkulturflaschen für den Koloniebildungsassay 48
3.2.3.8 Fixierung der Zellen 49
3.2.3.9 Färben der Zellen 49
3.2.3.10 Zählen der Kolonien und Auswertung 50

4 ERGEBNISSE 51

4.1 Charakterisierung der Zinkoxid-Nanopartikel 51

4.2 Die Überlebensfraktion der einzelnen Zelltypen in Abhängigkeit von ZnO-NP-Konzentration und Bestrahlung 52
4.2.1 Überleben der A549-Zellen nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung 54
4.2.2 Überleben der HNSCCUM-02T-Zellen nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung 56
4.2.3 Überleben der Fibroblasten nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung 59
4.2.4 Vergleiche zwischen den drei Zelltypen 62

4.3 Auswirkungen der Bestrahlung in Zellkulturschalen auf die Proliferation der einzelnen Zelltypen 66
4.3.1 Auswirkung von alleiniger Bestrahlung 66
4.3.1.1 A549-Zellen nach Bestrahlung 66
4.3.1.2 HNSCCUM-02T-Zellen nach Bestrahlung 67
4.3.1.3 Fibroblasten nach Bestrahlung 68
4.3.2 Auswirkungen der alleinigen Behandlung mit ZnO NP 69
4.3.2.1 A549-Zellen nach Behandlung mit ZnO NP 70
4.3.2.2 HNSCCUM-02T nach Behandlung mit ZnO NP 71
4.3.2.3 Fibroblasten nach Behandlung mit ZnO NP 72

4.4 Synergismus, Antagonismus und additiver Effekt von ZnO NP und Bestrahlung 74

5 DISKUSSION 76

5.1 Eigenschaften der Zinkoxid-Nanopartikel 77

5.2 Verhalten der verschiedenen Zelltypen nach Behandlung 78

5.3 Synergismus, Antagonismus und additiver Effekt der Behandlung mit ZnO NP und Bestrahlung auf die verschiedenen Zelltypen 81

5.4 Ausblick auf mögliche therapeutische Anwendungen 83

6 ZUSAMMENFASSUNG 85

7 LITERATURVERZEICHNIS 88

8 ANHANG IX

9 DANKSAGUNG XII

10 TABELLARISCHER LEBENSLAUF XIII

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
ANOVA	*analysis of variance* (Varianzanalyse)
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
Aqua dest.	*aqua destillata* = destilliertes Wasser
CDKN1A	Gen, kodiert für Protein p21 (auch CDK-Inhibitor 1 = *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*)
CDKN2A	Gen, kodiert für Tumorsuppressor-Protein $p16^{INK4a}$
CFA	*colony formation assay* (Koloniebildungsassay)
CI	*combination index*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonucleinsäure; DNS)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
E. coli	*Escherichia coli*
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	*epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor)
EPR	*enhanced permeability and retention effect*
ErbB	Familie von vier Rezeptor-Tyrosinkinasen
DPBS	*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
FB	Fibroblasten
FCS	*fetal calf serum* (Fetales Kälberserum)
Gy	Gray
h	*hours* (Stunden)
HNSCC	*head and neck squamous cell carcinoma* (Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs)
HPV	Humane Papillomaviren
IL	Interleukin
LDH	Lactatdehydrogenase
LOH	*loss of heterozygosity* (Verlust der Heterozygotie)
min	*minutes* (Minuten)
MVB, MVK	*multivesicular bodies* (multivesikuläre Körper)
MW	Mittelwert

NIR	Nahinfrarot
NP	Nanopartikel
NSCLC	*non-small cell lung carcinoma* (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PDT	photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglycol
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg
PIK3CA	*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (Gen, kodiert für das Protein p110α)
pRb	Retinoblastom-Protein
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAS	G-Protein Ras (*Rat sarcoma)*
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
ROS	*reactive oxygen species* (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute = U/min)
RT	Raumtemperatur
SD	*standard deviation* (Standardabweichung)
SDT	sonodynamische Therapie
SF	*surviving fraction* (Überlebensfraktion)
SiO_2	Siliciumdioxid, Silica
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. mutans	*Streptococcus mutans*
TE	Trypsin-EDTA
TiO_2	Titandioxid
TNM	*tumor node metastasis classification* (Tumorstadienklassifikationssystem)
TP53	*TP53*-Tumorsuppressorgen (p53 = von ihm kodiertes Protein)
TZL	Tumorzelllinie
UCN	*upconversion nanoparticles*
US	Ultraschall
Zn, Zn^{2+}	Zink
ZnO	Zinkoxid
ZnO NP	Zinkoxid-Nanopartikel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle. 35
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Zellkulturmedien sowie deren Zusammensetzung. 37
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien. 37
Tabelle 4: Verwendete Geräte und deren Bezugsfirmen. 39
Tabelle 5: Verwendete Software und deren Herausgeber. 41
Tabelle 6: Schematische Darstellung des Ablaufs des Colony Formation Assays (CFA). 46
Tabelle 7: Behandlungskombinationen für alle Tumorzellinien sowie Fibroblasten 48
Tabelle 8: Überlebensfraktion aller Zelltypen bei allen getesteten Behandlungen 52
Tabelle 9: Synergistischer, antagonistischer und additiver Effekt von ZnO NP und Bestrahlung 75
Tabelle 10: Überlebensfraktion aller Zelltypen bei allen getesteten Behandlungen (einzelne Rohwerte) IX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modelle zur Entstehung von Tumorstammzellen 6
Abbildung 2: Signaltransduktionswege und mögliche Therapieansätze bei HNSCC 14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Endo- und Exozytose 18
Abbildung 4: Intrazelluläre Aufnahme von NP unterschiedlicher Größe über Endozytose 19
Abbildung 5: Mechanismus der PDT und SDT sowie des photokatalytischen Effekts 31
Abbildung 6: ZnO NP MV-114 35
Abbildung 7: Charakterisierung der ZnO NP 51
Abbildung 8: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie A549 bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung 55
Abbildung 9: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie A549 bei Behandlung mit 0 und 100 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen 56
Abbildung 10: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung 58
Abbildung 11: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T bei 0 und 100 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen 59
Abbildung 12: Überlebensfraktionen von primären Fibroblasten bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung 61
Abbildung 13: Überlebensfraktionen von primären Fibroblasten bei 0 und 80 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen 62
Abbildung 14: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 0 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen 63
Abbildung 15: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 50 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen 65
Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 nach Bestrahlung 67
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HNSCCUM-02T nach Bestrahlung 68
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Bestrahlung 69

Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 nach Behandlung mit ZnO NP 71
Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HNSCCUM-02T nach Behandlung mit ZnO NP 72
Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Behandlung mit ZnO NP 73
Abbildung 22: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 0 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen . XI

1 Einleitung und Ziele der Dissertation

Trotz einiger Fortschritte in der Therapie ist die Prognose von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich annähernd gleichbleibend schlecht. Eine vermutete Ursache hierfür ist die große genetische Heterogenität, die diese Karzinome sowohl zwischen als auch innerhalb individueller Tumore aufweisen. Um die klassische Therapie, bestehend aus Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie dementsprechend zu erweitern, sind in letzter Zeit weitere experimentelle Ansätze entwickelt worden. Dieses Spektrum umfasst die sogenannten *biologicals*, die auf unterschiedliche Art und Weise gezielt einzelne Proteine und Signalwege angreifen und die *targeted therapies*, mit denen man darauf abzielt, möglichst nur die Tumorzellen anzugreifen. Zu den letzteren zählen auch die Therapieansätze mit Nanopartikeln, die sich dafür besonders gut eignen könnten, da sie sich schon auf passivem Weg in den Tumorzellen anreichern sollten. Dies beruht auf dem EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*), der das Phänomen beschreibt, dass sich Nanopartikel aufgrund der Beschaffenheit der Gefäßmembranen leichter im Tumorgewebe anreichern und aufgrund des mangelnden lymphatischen Abflusses erschwert heraustransportiert werden. Verknüpft mit einer aktiven Targeting-Methode und der Tatsache, dass Zinkoxid (ZnO) in hoher Konzentration toxisch ist, scheinen Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) besonders gut für eine zielgerichtete Therapie geeignet zu sein. Da diese Nanopartikel außerdem nach Bestrahlung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen, was eine weitere Schädigung der Tumorzellen mit sich führt, erscheint eine Kombination der beiden Strategien besonders erfolgversprechend.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Kombination aus Strahlentherapie und Nanopartikeln zu untersuchen. Als *in-vitro*-Modell wurden Tumorzelllinien verwendet, die mit ZnO NP und Bestrahlung behandelt wurden. Als Vergleichsgruppe dazu dienten gesunde Fibroblasten.

Mit Blick auf spätere Therapiemöglichkeiten für Plattenepithelkarzinome sollten demnach folgende Fragestellungen mit dieser Arbeit beantwortet werden: Zum einen sollte untersucht werden, ob sich der therapeutische Effekt durch die Kombination von Bestrahlung und ZnO NP steigern lässt und ob sich zum anderen die beiden einzelnen Faktoren idealerweise nicht nur addieren, sondern sich gegenseitig verstärken, sich also ein synergistischer Effekt beobachten

lässt. Ein weiteres Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob durch diese Behandlungskombination im Vergleich zu gesunden Zellen bevorzugt Tumorzellen angegriffen werden können.

2 Literaturdiskussion

2.1 Tumore des Kopf- und Halsbereichs

Der Begriff Kopf-Hals-Tumore schließt eine Vielzahl an unterschiedlichen Ausprägungsformen von Tumoren ein, die aus verschiedenen Ursprungsgeweben entstehen können. Mit ihm werden Tumore der anatomisch und funktionell zusammenhängenden Regionen der Mundhöhle (Lippen, Zunge, Mundboden, Gaumen, Speicheldrüsen), des Rachens, des Kehlkopfes, der Nase und der Nasennebenhöhlen zusammengefasst. Andere Tumore, die zwar anatomisch in der Nähe liegen, etwa im Bereich der Schilddrüse oder der Speiseröhre, werden gewöhnlich nicht in diesen Begriff mit eingeschlossen, da sie zu anderen Organsystemen gehören (1).

Die in Deutschland mit 90 % am häufigsten vorkommende Ausprägungsform der Tumore im Kopf- und Halsbereich sind die Plattenepithelkarzinome, die Adenokarzinome – vor allem der Speicheldrüsen – sind mit etwas mehr als 5 % die zweithäufigste Gruppe (2). Plattenepithelkarzinome entwickeln sich aus den oberflächlichen Schichten der Haut und Schleimhaut und können daher, je nach Entstehungsort, verhornt oder unverhornt auftreten (3). Im Jahr 2013 gab es in Deutschland bei Männern etwa 13.000 und bei Frauen 4.500 Neuerkrankungen an bösartigen Tumoren im Kopf- und Halsbereich, für das Jahr 2020 wurde vor allem aufgrund der demografischen Entwicklung ein Anstieg auf etwa 14.300 (Männer), beziehungsweise 5.500 (Frauen) erwartet. Der aktuelle Trend für Männer ist jedoch leicht rückläufig (-0,7 %), für Frauen dagegen steigend (1,3 %). Die Daten entstammen dem aktuellen „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ des Robert-Koch-Instituts, der alle fünf Jahre aktualisiert wird (1). So kann man sagen, dass Männer sowohl häufiger als auch im Schnitt drei Jahre früher (im Schnitt mit 63 Jahren) als Frauen (mit 66 Jahren) erkranken (2). Auch liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen mit 61 % etwas höher als bei Männern mit 51 % (1).

Heutzutage weiß man, dass die Ätiologie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) multifaktoriell ist und dass es zahlreiche Risikofaktoren für HNSCC gibt. Zu den Wichtigsten zählen langjähriger Nikotin- und Alkoholabusus (4). Auf eine Kombination dieser beiden Faktoren sind mindestens 72 % der Kopf- und Halstumore zurückzuführen (5). Aus einer Studie von Hashibe et al. (5) geht hervor, dass

alleiniges Zigarettenrauchen ein größeres Risikopotential hat als alleiniger Alkoholkonsum. Von den vorhin genannten 72 % aller Kopf- und Halstumore werden von denselben Autoren (5) 4 % dem alleinigen Alkoholkonsum, 33 % dem Tabakkonsum und 35 % einer Kombination aus beidem zugeschrieben. Ein dritter Hauptrisikofaktor ist die Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV), die in letzter Zeit aufgrund der steigenden Erkrankungszahlen immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt ist (6). Vor allem der Hochrisikotyp HPV-16 wurde immer wieder als Risikofaktor nachgewiesen (6–8). Im Zusammenhang mit HPV ist auch die Lokalisation der Tumore ein entscheidender Faktor, sie werden sowohl mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen in Verbindung gebracht, als auch mit solchen der Mundhöhle, wobei letztere weniger oft HPV-positiv sind als die oropharyngealen (6). Außerdem haben Patienten mit HPV-positiven Tumoren, also vor allem Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, höhere Überlebenschancen als HPV-negative bei gleicher Behandlung (9). Des Weiteren konnte man positive Effekte einer Impfung schon bei anderen HPV-assoziierten Tumoren und Erkrankungen nachweisen (10), weswegen man sich davon auch gute Chancen bei der Prävention von Tumoren im Kopf- und Halsbereich verspricht, da in Deutschland mittlerweile eine Impfempfehlung – neben der für Mädchen – auch für Jungen im Alter von 9-14 Jahren gilt (11). Neben Alkoholkonsum, Rauchen und HPV, die mittlerweile als unabhängige Hauptrisikofaktoren gelten, sich im Falle von Alkohol und Rauchen aber auch beeinflussen können (8,12), gibt es noch zahlreiche weitere Nebenfaktoren. Zu ihnen zählen schlechte Mundhygiene sowie fehlende Zähne und die tägliche Benutzung einer Mundspüllösung (13). Außerdem wurden chronische mechanische Irritationen an der Mundschleimhaut wie etwa durch schlecht sitzenden Zahnersatz oder wiederkehrende Traumata, zum Beispiel durch Einbiss, mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle in Verbindung gebracht (14,15). Auch der Konsum anderer Genussmittel wie das Kauen der Betelnuss, vor allem zusammen mit Tabak, konnten besonders in Asien als Risikofaktor nachgewiesen werden (16). Viele Studien sowohl in Europa als auch in Asien haben aufgezeigt, dass bei einer Ernährung, die reich an frischem Obst und Gemüse ist und arm an Fleisch und anderen Tiererzeugnissen, das Entstehungsrisiko eines Tumors in der Mundhöhle oder dem Pharynx reduziert ist (17–19). Als weitere virale Ursache ist neben HPV das Epstein-Barr-Virus zu nennen, das vor allem mit Nasenrachenkarzinomen in Verbindung gebracht wird.

Es war das erste Virus, bei dem karzinogene Folgen entdeckt wurden, und es wird mittlerweile angenommen, dass es eher am Fortschreiten der Tumorentwicklung beteiligt ist, als an ihrer Entstehung (20,21). Diabetes Typ II birgt auch ein erhöhtes Risiko für verschiedene Tumore, für HNSCC im Speziellen konnte jedoch noch keine eindeutige Aussage getroffen werden (22). Jedoch wurde festgestellt, dass Metformin, das am häufigsten verschriebene orale Antidiabetikum für Diabetes Typ II, die Überlebenschancen für HNSCC verbessert (23). Für Plattenepithelkarzinome der Lippen – die anatomisch gesehen zwar noch zur Mundhöhle gehören, aber auch vom Sonnenlicht getroffen werden – zählt die UV-Strahlung mit zu den wichtigsten Risikofaktoren (24).

2.1.1 Molekulare Pathogenese von HNSCC

Heute geht man davon aus, dass für die Karzinogenese eine Kette an Ereignissen notwendig ist, die durch ein Zusammenwirken verschiedener endogener und exogener Faktoren beeinflusst werden, wobei letztere die Hauptrolle spielen. Der Entstehungsprozess kann sich über mehrere Jahre oder Jahrzehnte erstrecken (25). Im Folgenden sollen die wichtigsten Aspekte der molekularen Pathogenese von Tumoren und insbesondere von HNSCC beschrieben werden.

Am Anfang entstehen durch mindestens eine stabile Mutation potenzielle Tumorzellen, die sich phänotypisch anfangs noch nicht von gesunden Zellen unterscheiden, weswegen sich ihre Identifizierung bislang als sehr schwierig darstellt (26). Außerdem führt oft eine einzige Mutation noch nicht alleine zur Tumorentstehung, wie beim RAS-Gen gezeigt wurde (25). Daraufhin können weitere Mutationen folgen und aus den entstandenen benignen Tumoren werden maligne (27). Diese vielen verschiedenen Mutationen führen schlussendlich dazu, dass der gleiche Tumor oft aus mehreren Zellklonen mit unterschiedlichen Genotypen besteht. Diese genetische Instabilität ist für Tumorzellen charakteristisch. Auch HNSCC sind bekannt für ihre hohe genetische Heterogenität (26,28,29). Dieses Phänomen der Heterogenität wird unter anderem auch durch Tumorstammzellen mit verursacht, was im Folgenden näher erklärt werden soll. Die Tumorstammzellen haben stammzellähnliche Eigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierung. Außerdem sind sie

spezifisch für ein Gewebe und teilen sich langsam (30,31). Für ihre Entstehung gibt es drei Erklärungsansätze, der erste ist, dass eine normale, gewebsspezifische Stammzelle mehrere genetische und epigenetische Veränderungen durchläuft und so zur Tumorstammzelle wird. Eine zweite mögliche Erklärung ist, dass eine Stammzelle selbst in einer Entwicklungsstufe einen präkanzerösen Phänotyp annimmt. Der dritte Erklärungsansatz ist, dass vollständig entwickelte, differenzierte Tumorzellen durch Veränderungen in Signalwegen und Regulationsmechanismen sich wieder dedifferenzieren und so zu Tumorstammzellen werden. Alternativ dazu gibt es auch die Möglichkeit, dass sich reife orale Epithelzellen dedifferenzieren und so zu Tumorstammzellen werden (31). Diese drei Möglichkeiten werden in Abbildung 1 dargestellt.

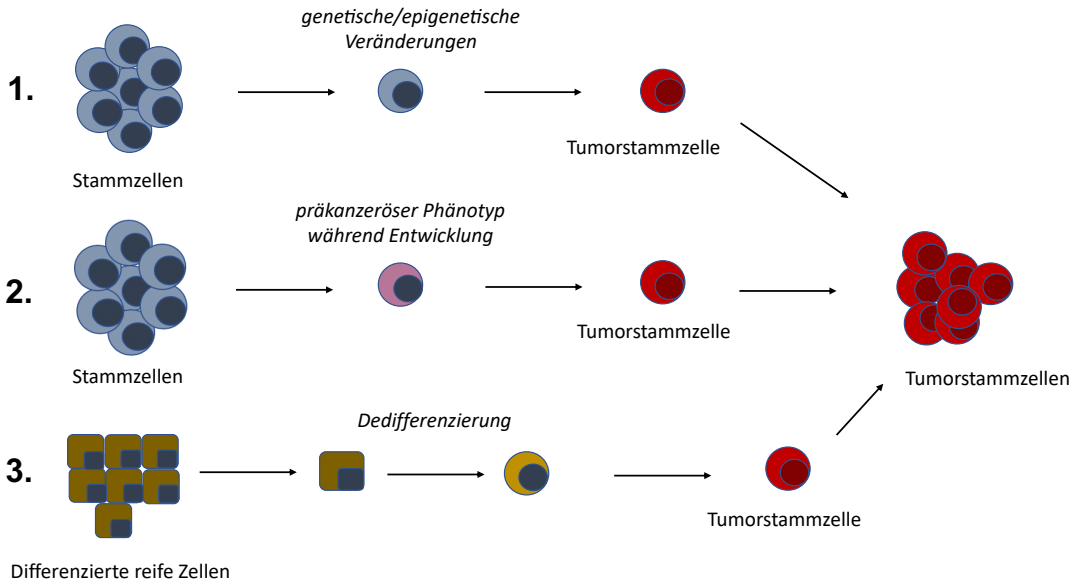


Abbildung 1: Modelle zur Entstehung von Tumorstammzellen

In dieser Abbildung sind die drei verschiedenen Theorien zur Entstehung von Tumorstammzellen dargestellt. Verändert nach Simple et al., 2015 (31)

Tumorstammzellen werden neben dem Tumorwachstum auch wesentlich für lokale Rezidive durch Therapieresistenzen mit verantwortlich gemacht. Das macht sie zu einem attraktiven Ziel für neue Therapieansätze, was sich allerdings wegen ihrer Heterogenität noch als schwierig herausstellt (30).

Die starke intratumorale Heterogenität kann wiederum bei verschiedenen Patienten mit dem gleichen Tumortyp zu unterschiedlicher Ansprache auf die gleiche Behandlung führen, da die zufallsbedingte Verschiedenheit der

Mutationen den selektierten Zellklonen auch Resistenzen gegenüber sowohl der Chemo-, als auch der Strahlentherapie verleihen kann. Auch kann ein anfangs sensitiver Tumor im Laufe einer Therapie durch die genetische Instabilität resistent werden, was sogar durch die mutagene Wirkung vieler Zytostatika und der ionisierenden Strahlen selbst begünstigt werden kann (26). Die Ursache für die intratumorale Heterogenität ist die Feldkanzerisierung, auf die am Ende dieses Kapitels noch genauer eingegangen wird. Ihr liegt die Theorie zugrunde, dass ein Tumor viele verschiedene (multifokale) Ausgangszellen besitzt, in denen unabhängige Mutationen stattgefunden haben (32).

Wenn die durch genotoxische Einflüsse ausgelösten Mutationen in Onkogenen bzw. Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen erfolgen, führt das zur Entstehung von Tumorzellen. Diese Gene steuern das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod (Apoptose) in einer Zelle (26). Als besonderes Tumorsuppressorgen ist *TP53* zu nennen, dessen Bedeutung schon früh entdeckt wurde, obwohl man es anfangs für ein Onkogen hielt (33–40). Das von ihm kodierte Protein p53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Mutationen dieses Gens wurden beim Menschen in ca. 50 % aller Tumore gefunden. Es spielt sowohl bei der Kontrolle der Proliferation einer Zelle als auch bei der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle, und bei sehr großen Schäden an der DNA leitet es die Apoptose ein (41). Auch speziell für HNSCC ist es von großer Bedeutung, da *TP53* eine wichtige Rolle bei der Vorhersage des Therapieergebnisses bei Patienten spielt, so gibt es z. B. eine starke Korrelation zwischen einer Mutation in *TP53* und dem Überleben der Patienten, jedoch keine zwischen Überexpression von p53 und dem Patientenüberleben. Die Patienten mit einer Mutation in *TP53* zeigten mit durchschnittlich 12,5 Monaten eine deutlich kürzere Überlebenszeit als die Patienten ohne Mutation, welche sich bei diesen auf über 90 Monate belief (42,43). Ein weiteres wichtiges Tumorsuppressorprotein ist das Retinoblastom-Protein (pRb), welches das Replizieren von geschädigter DNA durch Inhibition der Aktivität der Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie verhindert. Cyclin D1/CDK4/CDK6-Komplexe können E2F durch Phosphorylierung von pRb zwar wieder freisetzen, dies kann aber durch $p16^{INK4a}$ (kodiert durch *CDKN2A*) und p21 (auch: CDK-Inhibitor 1, kodiert durch *CDKN1A*) verhindert werden. Mutationen in den Signaltransduktionswegen von p53 und pRb resultieren in unbegrenztem

replikativem Potential und Immortalisierung, was ihre Bedeutung noch unterstreicht (29).

Neben den besprochenen wichtigsten Tumorsuppressorgenen für HNSCC soll noch auf wichtige Onkogene eingegangen werden, die in Tumoren nicht wie die Tumorsuppressorgene ausgeschaltet, sondern überexprimiert werden. Grandis und Tweardy (44) konnten zeigen, dass das *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Gen in Zellen des HNSCC in über 90 % der Fälle im Vergleich zu gesunden Mukosazellen überexprimiert wird. Dabei lag die mRNA dieses Gens in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen aus der Kontrollgruppe um den Faktor 69 erhöht vor (44). Dies ist auf eine Überexpression auf Transkriptionsebene zurückzuführen, obwohl bei nur 1-7 % der betroffenen Patienten das zugrundeliegende Gen Punktmutationen aufweist. EGFR (auch ErbB-1) ist Mitglied der ErbB-Familie und ist eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase, die nach Bindung eines Wachstumsfaktors über verschiedene Signaltransduktionswege das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindern kann (29). Dieser Signalweg und weitere, die bei HNSCC oft dysreguliert sind, werden in Abbildung 2 (S.14) schematisch dargestellt. Eine höhere EGFR-Expression korreliert außerdem mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Resistenz gegen die konventionelle Strahlentherapie (45,46).

Ein weiteres wichtiges Onkogen ist *PIK3CA*, das auch eine wichtige Rolle für die Zellproliferation und das Überleben spielt und besonders interessant ist, weil eine Mutation von ihm sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen HNSCC vorkommen kann (47).

Ein Erklärungsversuch für die oft größeren, flächigen von Tumoren oder Präkanzerosen (siehe nächster Absatz) betroffenen Bereiche im Kopf-Hals-Bereich war schon 1953 der von Slaughter et al. geprägte Begriff der Feldkanzerisierung (48). Er sollte neben diesen dysplastischen Veränderungen sowohl die hohen Rezidivraten nach chirurgischer Exzision als auch das hohe Risiko für das Auftreten mehrerer unabhängiger Tumore in den Schleimhäuten erklären (48). Dieses Modell der dysplastisch veränderten Felder ist immer noch Gegenstand der Forschung, da man aufgrund der technischen Möglichkeiten erst Jahrzehnte später größere Schritte zu einem besseren Verständnis gemacht hat. Erst in den 1980er Jahren konnte Slaughters Theorie durch klinische und histologische Methoden bewiesen werden (49). Califano et al. (50) haben 1996 zum ersten Mal ein Modell zur genetischen Entwicklung von HNSCC aufgestellt,

basierend auf dem Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) in Chromosomenarmen. Bei HNSCC sind davon vor allem die Chromosomenarme 3p und 9p betroffen. Anhand der betroffenen Chromosomenarme kann auch das Stadium des Tumors zeitlich eingeordnet werden, so handelt es sich bei einem LOH an den Chromosomenarmen 3p, 9p und 17p um ein frühes Stadium, ein solcher Verlust wurde schon in Dysplasien nachgewiesen, bei den Chromosomenarmen 11q, 4q und 8p handelt es sich hingegen um ein spätes Stadium der Karzinogenese (50). Damit lässt sich die Entwicklung der Feldkanzerisierung auch durch schrittweise Veränderung in den Chromosomenarmen und dadurch entstehende, sich vergrößernde, dysplastische Felder erklären.

Anhand des Modells nach Califano et al. (50) können auch fakultative Präkanzerosen für Plattenepithelkarzinome wie Erythroplakien oder Leukoplakien untersucht werden, da nicht alle HNSCC *de novo* entstehen, sondern sich auch aus diesen makroskopisch sichtbaren Vorstufen entwickeln können. Die sichersten Anzeichen für eine maligne Transformation sowohl in einer Leukoplakie als auch an Resektionsgrenzen einer Tumorexzision sind genetische Veränderungen an den Chromosomenarmen 3p und 9p, kombiniert mit Mutationen im *TP53* (befindet sich auf 17p) (47). Die Leukoplakie ist die häufigste Präkanzerose bei HNSCC mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 2 % (51) und wird als nicht abwischbarer weißlicher Belag charakterisiert, der keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann (52). Die Erythroplakie wird ebenfalls nach dem Ausschlussprinzip diagnostiziert, sie ist ein roter Bereich, der keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann. Diese beiden Erscheinungsformen zählen mit dem Lichen planus zu den häufigsten der insgesamt neun makroskopisch sichtbaren Präkanzerosen für HNSCC, die am häufigsten durch die Risikofaktoren Nikotinkonsum und chronische Entzündungen hervorgerufen werden. (52).

Nicht nur durch LOH, sondern auch durch Mutationen in *TP53* lässt sich das Phänomen der Feldkanzerisierung erklären. So hat man Felder von Zellklonen einer in *TP53* mutierten Zelle gefunden, die dann durch weitere Mutationen zu größeren Feldern werden können. Diese Felder wurden in Schleimhäuten bis zu einer Größe von teils > 7 cm nachgewiesen (53). Es gibt auch Theorien, die die schon oben erwähnten Krebsstammzellen als Mechanismus hinter der Feldkanzerisierung sehen. Mit der Weiterentwicklung und Erkennung

spezifischer Tumorstammzellmarker könnten sich neue Behandlungsziele ergeben und die Prognostizierungsmöglichkeiten und Chancen auf frühzeitige Erkennung könnten sich deutlich verbessern (31).

2.1.2 Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich

Die Therapie von HNSCC richtet sich ganz wesentlich nach der Klassifizierung des Tumors. Hier gibt es verschiedene Einteilungsprinzipien, die alle unterschiedliche Informationen bieten. Die Folgenden sind im Wesentlichen entnommen aus: Hiddeman & Bartram: Die Onkologie, 2010 (26). Eine ist die histologisch-histogenetische Typisierung, die sich mit der Zytologie, der Wuchsform, der Expression gewebespezifischer Markerproteine und charakteristischer genetischer Aberrationen beschäftigt. Daneben gibt es das Prinzip der Graduierung, also der Bestimmung des Malignitätsgrades. Diese liefert Informationen über die Zytologie und Wuchsform des Tumors, aber auch über die Mitoserate, den Nachweis spezifischer zellulärer Produkte, die Expression differenzierungsspezifischer Markerproteine und über histologische Entitäten, die Aufschluss über eine günstige bzw. ungünstige Prognose geben. Des Weiteren gibt es noch die klassische TNM-Stadien-Einteilung, mit der man die anatomische Ausdehnung des Tumors näher charakterisieren kann. In verschiedenen Stufen wird tumorspezifisch die lokale Tumorausbreitung erfasst (**T**1-4), außerdem werden die regionären Lymphknotenmetastasen (**N**0-2), die Fernmetastasen (**M**0-1) und serologische Parameter (S0-3) erfasst. Diese letzte Einteilung ist klinisch sehr wichtig, sie spielt eine große Rolle bei der Therapieplanung, wobei aber auch generelle Aspekte des Patienten miteinbezogen werden müssen, wie z. B. Vorerkrankungen und der Allgemein- und Ernährungszustand. Somit muss für jeden Patienten anhand dieser Gegebenheiten ein individuelles Behandlungsmodell gefunden werden (26).

Die klassischen Säulen der Tumortherapie sind die Chirurgie, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Bei frühen Stadien (I und II) wählt man meist ein Verfahren alleine, d. h. entweder Strahlentherapie oder Chirurgie, welche hier beide sehr ähnliche Ergebnisse versprechen (54). Eine gleichzeitig dazu stattfindende Chemotherapie hat bei HNSCC zudem in einem Zeitraum von 5 Jahren einen Überlebensvorteil von 4,5 % bewirkt, verglichen mit der

Durchführung nur einer regionären Behandlung (55). In späteren Stadien, also bei nicht-metastasiertem Tumor, aber mit lokal fortgeschrittenem Wachstum, ist das Standardvorgehen Chirurgie mit postoperativer Radiotherapie. So ist hier zwar eine radikale Resektion das Ziel, aber mit größtmöglicher Erhaltung der Funktionen in den Geweben, wobei es hier oft sehr schwierig ist einen Kompromiss zu finden. Die Lebenserwartung 5 Jahre nach einer solchen Behandlung liegt zwischen 35 und 65 % (54). Für nichtresezierbare Tumoren war lange Zeit die alleinige Radiotherapie Standard, die mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15-25 % einhergeht. Da mittlerweile die Vorteile von begleitender Chemotherapie bekannt sind (55), wird diese überwiegend durchgeführt, wenn es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt. Bei wiederkehrenden und metastasierenden Tumoren wird – mit palliativem Ziel – die alleinige Chemotherapie eingesetzt (54). Hier war der Standard lange eine Kombination aus Cisplatin und 5-Fluorouracil, wo man mit einer Ansprechrate von 27-32 % und 5,7-8,7 Monaten Überlebenszeit rechnen kann. Heutzutage ist die Standard-Chemotherapie eine Kombination aus einer platinbasierten Therapie mit 5-Fluorouracil und Cetuximab, einem relativ neuen Medikament, auf das weiter unten noch genauer eingegangen wird (56).

Leider ist die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs, also das Wiederauftreten der gleichen Tumorart als Sekundärtumor, im frühen Stadium mit ca. 10-20 % und im späten mit ca. 50 % relativ hoch. Auch haben Patienten mit Rezidiven, wie auch solche mit Metastasen, schlechte Prognosen, die mittlere Überlebensrate beläuft sich in beiden Fällen auf unter einem Jahr (57). Wie schon in Kapitel 2.1.1 beschrieben, sind Resistenzen gegen die konventionellen Therapieansätze wie Bestrahlung und Chemotherapie ein zentrales Problem bei der Behandlung von HNSCC, ausgelöst durch Faktoren wie die große genetische Heterogenität und das Vorkommen von Tumorstammzellen (28–30). Besonders eine Resistenz gegen Strahlentherapie ist eine wichtige Ursache für die – trotz großer Erkenntnisgewinne auf molekularer Ebene bei HNSCC – stagnierenden Behandlungserfolge (28). Ein Grund für das mangelnde Ansprechen des Tumors auf die Bestrahlung kann Hypoxie in seinem Gewebe sein (58), da Sauerstoff die Wirkung der Bestrahlung verstärkt. Die ionisierende Strahlung spaltet Wassermoleküle in Radikale (Wasserstoff- und das Hydroxyl-Radikal), die mit dem Sauerstoff reagieren. Die Produkte dieser Reaktion sind ebenfalls instabil und können Proteine, Nukleinsäuren und Zellmembranen beschädigen, was zum

Zelltod führt. Als Überbegriff für solche Verbindungen hat sich der Name reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) etabliert, mit dem folgende Verbindungen zusammengefasst werden: Wasserstoffperoxid (H_2O_2), organische Hydroperoxide (ROOH), das Hyperoxid-Anion (alte Bezeichnung: Superoxid-Anion; $O_2^{\bullet -}$) und das Hydroxylradikal (OH•) (59). Dieses Wissen wird bereits in Form der hyperbaren Sauerstofftherapie (*hyperbaric oxygen therapy*) als Adjuvans zur Strahlentherapie angewendet, da durch den erhöhten Druck der Sauerstoff auch in schlecht vaskularisierte Gewebe eindringen kann. So konnten schon in mehreren Studien mit HNSCC positive Effekte gezeigt werden, etwa eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle, der allgemeinen Überlebenschancen der Patienten, und eine Verringerung der unerwünschten Nebenwirkungen der Strahlentherapie wie Läsionen des benachbarten Gewebes. Als Grund wurde hierfür die geringere Strahlendosis genannt, die in Kombination mit dem hyperbaren Sauerstoff verwendet werden konnte (60).

Eine Resistenz gegen Strahlentherapie kann aber auch durch Veränderungen in intrazellulären Signaltransduktionswegen ausgelöst werden, die zuständig sind für DNA-Reparaturen, Replikation, Zellzyklus und Apoptose. Die Wichtigsten von diesen im Hinblick auf HNSCC sind der EGFR-, PI3K/Akt- und p53-Signalweg (46,58).

Im Hinblick auf diese Defizite bestehender Therapien wird vermehrt an alternativen Therapiemöglichkeiten geforscht, die als gezielte Krebstherapie (englisch: *targeted therapy*) bezeichnet werden und mit den konventionellen Therapien kombiniert werden. Bei HNSCC ist der erste und einzige, seit 2004 für Patienten zugelassene, Wirkstoff dieser Art Cetuximab (Erbitux®, ImClone Systems, Bristol-Myers Squibb und Merck KGaA), der als Ergänzung zur Strahlen- oder Chemotherapie verwendet wird (28,61). Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper vom Typ IgG1, der die ligandenabhängige Aktivierung und Dimerisierung von EGFR inhibiert und so die Zellproliferation hemmt und proapoptotische Signalwege in der Zelle stimuliert. Des Weiteren hindert Cetuximab EGFR auch daran, nach Übersiedelung in den Zellnukleus Doppelstrangbrüche an der DNA zu reparieren. Über seine Eigenschaft als Isotyp IgG1 kann Cetuximab außerdem eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität gegen Tumorzellen auslösen, die seine zahlreichen immunotherapeutischen Eigenschaften erklärt. So zählen dazu unter anderem die Fähigkeit, Killerzellen zu mobilisieren, neutrophile Granulozyten zu aktivieren

und die dendritische Zellreifung zu stimulieren. Außerdem verstärkt Cetuximab die Aktivität einiger Chemotherapeutika, einschließlich Cisplatin (57,62). Im Hinblick auf die Therapie von HNSCC konnte man zeigen, dass Cetuximab in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem Plattenepithelkarzinom signifikant um einige Monate verlängert (62).

Jedoch gibt es auch bei dieser Therapie Anzeichen von Resistenzen durch verschiedene Mechanismen in HNSCC, die man z. B. durch Anzielen von nicht nur einem Rezeptor der ErbB-Familie, Blockieren von anderen Signalwegen in HNSCC und einem Eingriff an einer anderen Stelle im Signalweg als dem Rezeptor zu umgehen versucht. Ein Beispiel für die Nutzung eines solchen anderen Angriffspunkts ist Afatinib (Giotrif®, Boehringer Ingelheim), ein oral einzunehmender Wirkstoff, welcher irreversibel an die gebildeten Dimere der Rezeptoren der ErbB-Familie (EGFR, ErbB2 und ErbB4) bindet und so eine Signalübertragung verhindert. Er befindet sich für die Behandlung bei HNSCC jedoch noch in der klinischen Testphase (45). Einige wichtige Signalwege und Möglichkeiten, dort therapeutisch einzugreifen, sind in Abbildung 2 (siehe nächste Seite) dargestellt.

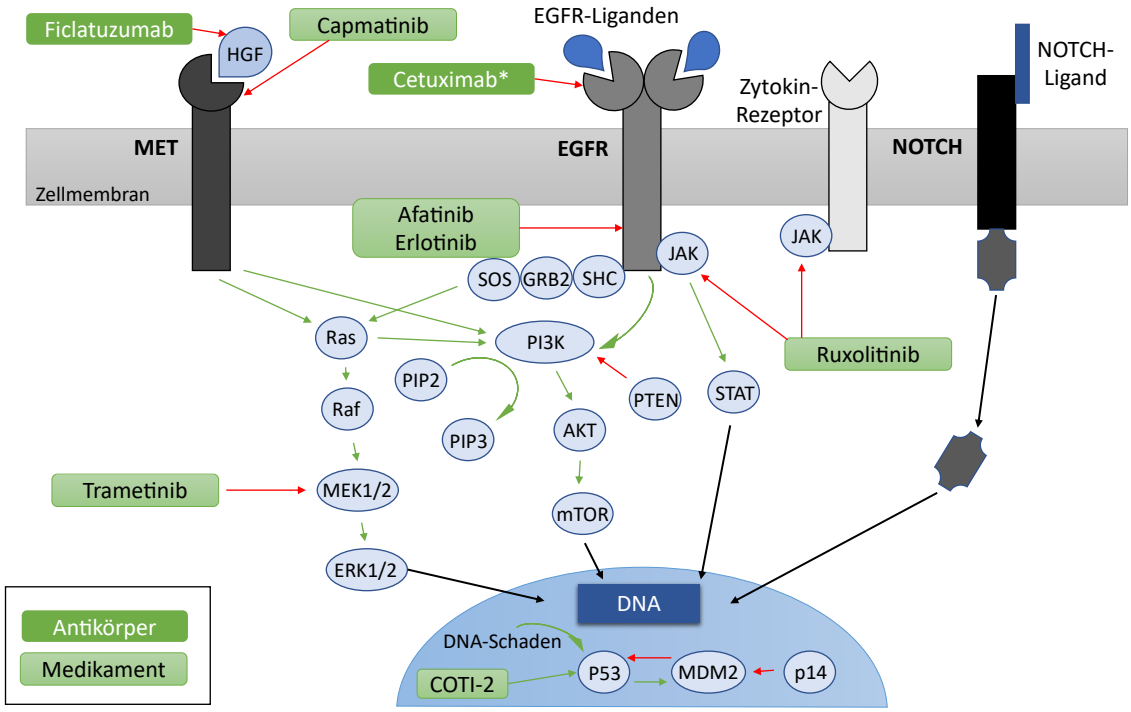


Abbildung 2: Signaltransduktionswege und mögliche Therapieansätze bei HNSCC

Schematische Darstellung der am häufigsten im Tumor veränderten Signaltransduktionswege bei HPV-negativen HNSCC und mögliche therapeutische Ansätze (grüne Boxen), die entweder schon klinisch angewendet werden (*) oder daraufhin getestet werden. Die roten Pfeile stellen eine Inhibition dar, die grünen eine Aktivierung, bzw. den nächsten Schritt in der Signalkette. Verändert nach Alsahafi et al., 2019 (28)

Leider konnten trotz dieser Fortschritte in der molekularen Krebsforschung die klinischen Therapieerfolge nicht annähernd so schnell verbessert werden. In den USA hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate von 1977 bis 2012 von 52,5 % nur auf 67 % verbessern lassen und in den letzten Jahren (2010-2014) ist die Todesrate annähernd gleich geblieben (63). Angesichts dieser Zahlen und der oben aufgeführten Problematik der Resistenzen, werden dringend neue Therapieansätze benötigt, die den individuellen molekularen Eigenschaften der einzelnen HNSCC Rechnung tragen, da sich die einzige derartige Einteilung derzeit auf HPV-positiv oder -negativ beschränkt. So könnte man mit individuellen Therapiemöglichkeiten idealerweise jeden Tumor in seiner speziellen Ausprägung individuell behandeln (28,45).

2.2 Zinkoxid-Nanopartikel

Die Nanotechnologie hat seit der Erfindung des ersten Elektronenmikroskops 1931 von Ernst Ruska und Max Knoll in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen, da bei der Mikroskopie auch die Verwendung von Computern mit hinzugekommen ist, was wiederum neue Möglichkeiten eröffnete. Sie wurde von Richard P. Feynman 1959 in seiner berühmten Rede *„There's plenty of room at the bottom"* (64) vorgestellt und beschäftigt sich mit dem Verständnis, der Kontrolle und Umstrukturierung von Materie, die kleiner als 100 nm ist (65).

Nanopartikel (NP) im Allgemeinen bewegen sich auch in dieser Größenordnung (1-100 nm) und können aus einer Reihe von Materialien bestehen. Es gibt NP aus Metallen, Metall- oder Nichtmetalloxiden, sowie Halbleiter-NP und Kohlenstoff-NP (66).

Im Folgenden soll näher auf Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) eingegangen werden. Für biomedizinische Anwendungen sind ZnO NP unter anderem deswegen so interessant und vielversprechend, da Zink (Zn) an sich schon eines der wichtigsten Spurenelemente des menschlichen Körpers ist. Der tägliche Bedarf eines Menschen beläuft sich auf ungefähr 15 mg/d, und es ist in allen Körpergeweben aufzufinden, 85 % der Gesamtkörpermenge in Muskeln und Knochen, 11 % in Haut und Leber und der Rest in allen anderen Geweben und im Blut. In mehrzelligen Organismen befindet sich jedoch fast das gesamte Zink intrazellulär, davon sind 30-40 % im Nukleus, 50 % im Zytoplasma, in Organellen und spezialisierten Vesikeln, und der Rest befindet sich in der Zellmembran. Zink ist ein essenzieller Bestandteil von vielen Makromolekülen und an zahlreichen enzymatischen Reaktionen beteiligt, da es neben einer strukturellen Rolle oft auch eine katalytische spielt. Eine bekannte Ausprägung sind die Zinkfingerdomänen in Proteinen, die es ihnen erlauben, mit anderen Proteinen oder der DNA oder RNA zu interagieren (67).

Zink in Verbindung mit Sauerstoff als Zinkoxid (ZnO) besitzt Eigenschaften eines Halbleiters, elektrische Leitfähigkeit, außerdem optische und piezoelektrische Eigenschaften und findet Verwendung in der chemischen Sensorik (66,68). Aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften wird es in vielen Industriezweigen genutzt: in der Elektronik und Lasertechnologie, als Photokatalysator in der Wasserstoffproduktion sowie auch wegen der geringen Toxizität, der hohen

Biokompatibilität und der biologischen Abbaubarkeit von ZnO in der Biomedizin (69). Unter gängigen Umgebungsbedingungen liegt ZnO stabil in der Wurtzit-Struktur vor, unter anderen Bedingungen bzw. durch andere Herstellungsprozesse kann es weitere Strukturen (Natriumchlorid- und Zinkblende-Struktur) annehmen (70).

Es gibt zahlreiche Verfahren, mit denen sich ZnO und damit auch ZnO NP herstellen lassen. Zu ihnen zählen die chemische Gasphasenabscheidung, die Präzipitation in Wasserlösung oder Mikroemulsion, die Hydrothermalsynthese, der Sol-Gel-Prozess und mechano-chemische Prozesse. Dadurch lässt sich steuern, welche Eigenschaften, Größe, Form und Ultrastruktur die Partikel haben sollen. So kann Zinkoxid zahlreiche ein-, zwei-, oder dreidimensionale Formen in Nanogröße annehmen, wovon die eindimensionalen die häufigsten sind. Zu ihnen zählen unter anderem stangen-, nadel-, helix-, ring- und kammförmige Strukturen. Zweidimensionale Strukturen sind z. B. Platten, Blätter oder Pellets in Nanogröße und dreidimensionale können Blumen-, Löwenzahn-, oder Schneeflockenformen sein (69).

Ein großer Vorteil von NP ist es außerdem, dass man ihnen durch Umschließen mit einer Außenhülle und Modifikation derselbigen leicht ganz neue Eigenschaften geben kann. Durch Veränderungen des Zeta-Potentials kann man beispielsweise die elektrostatischen Charakteristika von Metalloxid-NP verändern. Auch kann man sie mit Chitosan, synthetischen Polymeren oder Siliciumdioxid (auch Silica genannt) umhüllen, was vor allem ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin erweitern kann, weil dadurch Faktoren wie die Toxizität, die Dauer der Zirkulation im Blut oder die Elimination über die Nieren beeinflusst werden können. Eisenoxid-NP mit veränderter Hülle wurden auch schon mit Erfolg als Kontrastmittel bei bildgebenden Verfahren getestet (71,72).

Speziell für NP ist auch ihre Größe maßgeblich bestimmend für ihre Eigenschaften. Denn je kleiner der Durchmesser ist, desto größer ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Damit kann wiederum eine größere Anzahl an Atomen auf der Oberfläche liegen, was die NP hochreaktiv macht und sie mit anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften ausstattet, als bei größeren Partikeldurchmessern möglich wäre (73). Auch zirkulieren sie länger im Blutkreislauf, je kleiner sie sind und je schwerer ihre – falls vorhandene – Polyethylenglycol-Hülle ist (74). Hier gibt es jedoch auch Begrenzungen, so

werden nämlich kleine Partikel ≤ 10 nm relativ schnell durch die Nieren herausfiltriert und ausgeschieden (75).

Neben Faktoren wie der Form und Zusammensetzung hat die Größe der NP eine maßgebliche Auswirkung auf die zelluläre Aufnahme. So haben mehrere Studien gezeigt, dass eine Größe von 50 nm in einem thermodynamischen Modell (76) und experimentell bei sphärischen mesoporösen Silica-NP (77) bzw. 40-50 nm bei Gold- und Silber-NP (78) die höchste zelluläre Aufnahme mit sich bringt.

Bei einem der Aufnahmewege für NP handelt es sich um die Endozytose, ein energieabhängiger Prozess, der Zellen im Allgemeinen erlaubt, Ionen und Moleküle aufzunehmen. Man kann dabei verschiedene Wege unterscheiden, die rezeptorabhängige Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose und die Phagozytose, die darauf spezialisierten Phagozyten wie z. B. Makrophagen vorbehalten ist. Des Weiteren gibt es die Makropinozytose, bei der unspezifisch sowohl Flüssigkeiten als auch Partikel aufgenommen werden und dabei große Vesikel (0,2-5 µm) gebildet werden und die Pinozytose, bei der kleinere Vesikel gebildet werden (~ 100 nm) (79). Einen Überblick über die Formen der Endozytose verschafft Abbildung 3 (siehe nächste Seite).

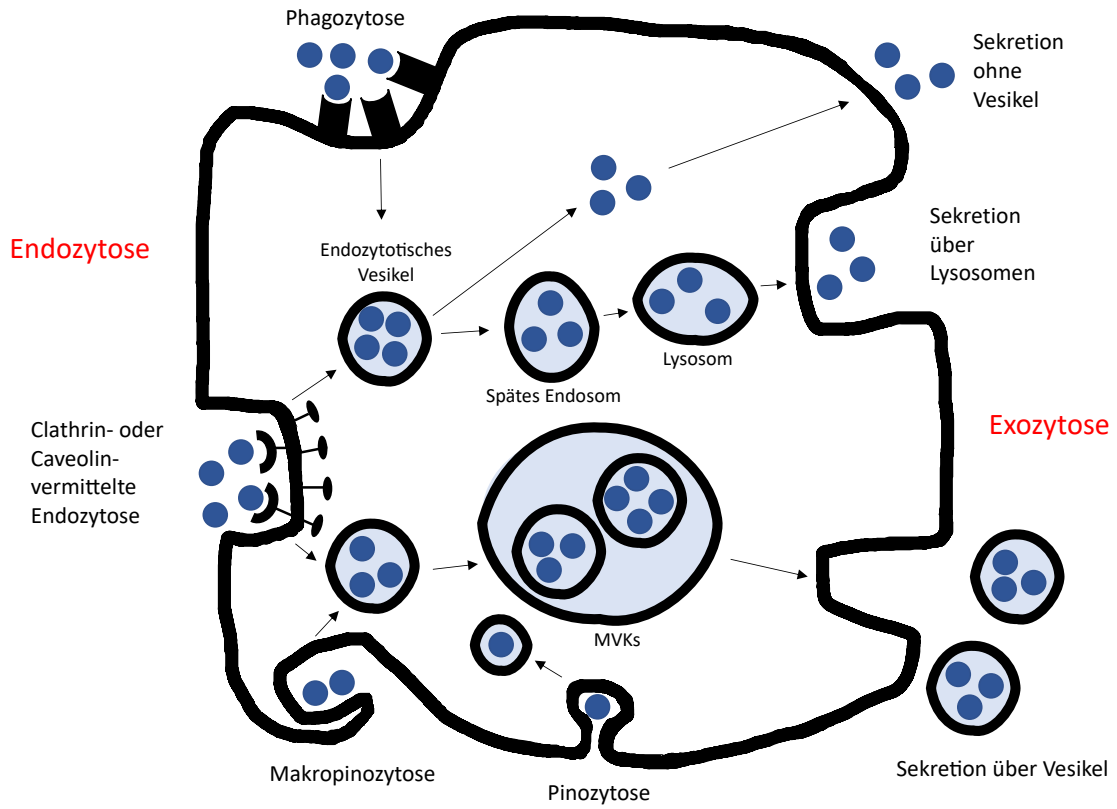


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Endo- und Exozytose

In dieser Abbildung sind die verschiedenen Wege zu sehen, wie NP durch Endozytose aufgenommen werden können, dies sind Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose, Phagozytose, Makropinozytose und Pinozytose. Des Weiteren kann man die Wege sehen, durch welche die NP die Zelle wieder verlassen können, dies sind Sekretion über Lysosomen, Vesikel, oder ohne Vesikel. Abkürzung: MVK = multivesikuläre Körper. Verändert nach Oh und Park, 2014 (79)

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Liganden auf der NP-Oberfläche an Rezeptoren der Zellmembran, woraufhin die NP von der Membran umschlossen werden und in die Zelle gelangen können. Die optimale Größe der aufzunehmenden Partikel für diesen Prozess, welcher in Abbildung 4 schematisch dargestellt ist, liegt zwischen 30 und 60 nm (76,80). Unabhängig von der Oberflächenbeladung, z. B. mit Antikörpern, oder der Grundbeschaffenheit der NP, zeigten die meisten *in-vitro*-Studien die höchste zelluläre Aufnahme bei einer Größe von 10-60 nm (80). Eine Studie von Jiang et al. (81) hat außerdem gezeigt, dass vor allem bei kleinen NP (dort mit einem Radius von 4 nm) deren extrazelluläre Konzentration eine große Rolle spielt, da

sie aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht einzeln endozytotisch aufgenommen werden können, sondern sie sich erst an der Zellmembran sammeln und bei Erreichen einer spezifischen Konzentration in Gruppen aufgenommen werden (siehe auch Abbildung 4B).

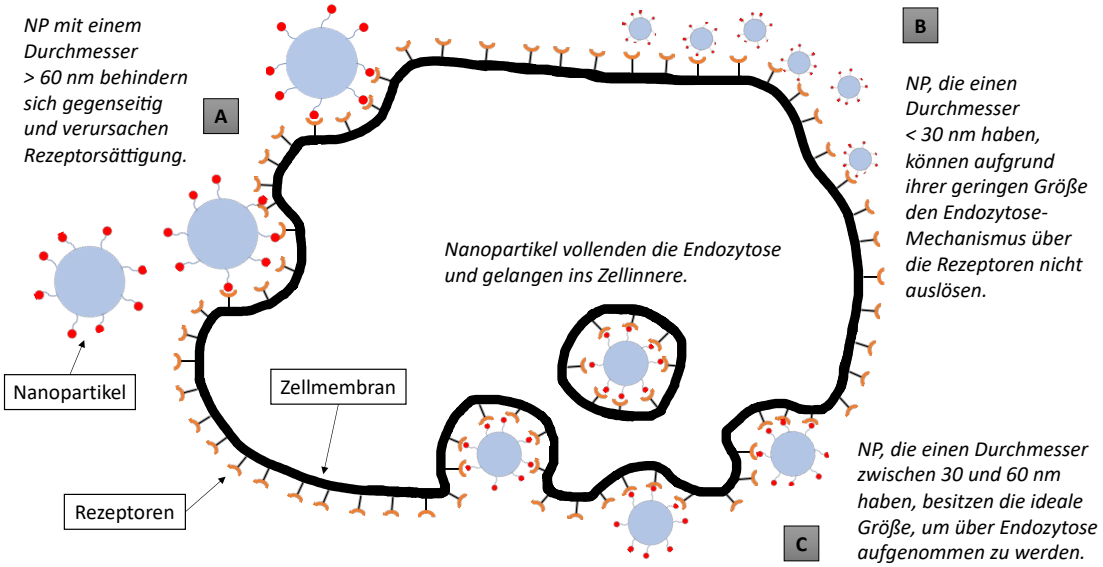


Abbildung 4: Intrazelluläre Aufnahme von NP unterschiedlicher Größe über Endozytose

Der Mechanismus der intrazellulären Aufnahme von NP über Endozytose ist von ihrer Größe (Durchmesser) abhängig. (A): NP mit einer Größe von > 60 nm können aufgrund ihrer Größe nicht an die geeignete Anzahl Rezeptoren binden, um den Aufnahmeprozess in die Zelle auszulösen. Sie binden an nicht ausreichend viele Rezeptoren, um aufgenommen zu werden, und hindern gleichzeitig durch die Blockierung potenziell freier Rezeptoren benachbarte NP an der Bindung, sodass kein NP aufgenommen werden kann. B): NP, die kleiner als 30 nm sind, können alleine den Mechanismus nicht auslösen, obwohl sie an Rezeptoren binden. Nur in Gruppen in nächster Nähe können sie von der Zellmembran umschlossen werden. (C): NP, die zwischen 30 und 60 nm groß sind, haben die ideale Größe für diesen Prozess und können effizient an Rezeptoren binden und nach Umschließung durch die Membran in die Zelle aufgenommen werden. Verändert nach Hoshyar et al., 2016 (80)

Eine andere Möglichkeit der zellulären Aufnahme ist über die passive Penetration, was besonders bei Zellen wichtig ist, die nicht zur Endozytose fähig sind, wie z. B. Erythrozyten (82). Gold- und Titandioxid-NP wurden von Erythrozyten in einer Studie nur bis zu einer Größe von 200 nm aufgenommen,

außerdem wurde im Durchschnitt weniger als ein NP pro Zelle aufgefunden (83), dagegen wurden von Silber-NP bei einer Größe von 50 nm die meisten im Vergleich zu anderen Größen detektiert, mit durchschnittlich mehr als 45 pro Zelle (84).
Weitere wichtige Faktoren für die zelluläre Aufnahme sind die Oberflächenladung der NP und die Identität der aufnehmenden Zelle. So zeigte sich bei Makrophagen eine erhöhte NP-Aufnahme bei größeren NP, bei Nicht-Makrophagenzellen dagegen die umgekehrte Beziehung zwischen Größe und Aufnahme von NP. Dabei ist jedoch unklar, ob der größenabhängigen Aufnahme von NP bei Makrophagen eine andere Ursache zugrunde liegt als bei anderen Zelltypen (80,85).

2.2.1 Anwendungen und Wirkmechanismen von ZnO NP

Zinkoxid-Nanopartikel werden aufgrund der schon dargestellten vielfältigen Eigenschaften bereits in ganz unterschiedlichen Bereichen verwendet, wo sie auch in direktem Kontakt mit dem menschlichen Körper stehen. Eine solche Anwendung findet z. B. als UV-Schutz in Sonnencremes statt (86). Hier macht man sich die hohe Absorption von Licht in den UVA- (315-400 nm) und UVB-Bereichen (280-315 nm) durch ZnO NP zunutze. NP gelten hier als sichere Anwendung, wenn sie oberflächlich auf der Haut bleiben oder höchstens in die oberste Hautschicht, das stratum corneum, eindringen, da sich hier nur verhornte Zellen befinden. In einer Studie mit kommerziell verwendeten ZnO NP war der größte gemessene Wert im stratum corneum 800 NP pro μm^3, und es wurden keine in den darunter liegenden Hautschichten entdeckt (87).
Mit zu den wichtigsten und nützlichsten Eigenschaften von ZnO NP zählen ihre antibakteriellen und antimykotischen Funktionen, was man sich auch in der Lebensmittelindustrie bei der Verpackung und gegen mögliche Pathogene auch in Lebensmitteln zunutze gemacht hat. Hier sind jedoch Bedenken zur Toxizität im Körper aufgrund der nicht ausreichenden Studienlage noch nicht ausgeräumt, und auch Verbraucher stehen der Nanotechnologie in Verbindung mit Lebensmitteln kritisch gegenüber (86,88).
Der Einsatz von ZnO NP gegen eine Vielzahl von bakteriellen Erregern wurde bereits getestet und man verspricht sich – nach genauerem Verständnis der Mechanismen ihrer Toxizität – ein vielfältiges Anwendungspotential, mit dem Ziel,

sie unter anderem gegen multiresistente Keime als Alternative zu Antibiotika einsetzen zu können (86,89). Eine interessante potenzielle Verwendung liegt auch im Bereich der Zahnmedizin gegen oralpathogene Keime wie z. B. *Streptococcus mutans*, dem Haupterreger von Karies. Hier wurde in einer Studie von Wang et al. (90) *in vitro* die antimikrobielle Wirkung von stangenförmigen ZnO NP mit einer Länge von 300-500 nm und einer Breite von 10-20 nm verglichen mit der Wirkung von Nanokompositen aus ZnO NP der gleichen Größe kombiniert mit oberflächlich aufgelagerten Silber (Ag)-NP (15 nm). Dafür wurden beide NP-Suspensionen in gleichen Konzentrationen jeweils mit den Bakteriensuspensionen für 24 h bei 37º C inkubiert und danach die minimale Hemmkonzentration und die minimale bakterizide Konzentration bestimmt. Es zeigte sich hier, dass die Ag/ZnO NP das Wachstum von *S. mutans* nach 24 Stunden zu 91 % gehemmt hatten und somit effizienter waren als die puren ZnO NP, die es nach der gleichen Zeit nur zu 50 % gehemmt hatten. In einer weiteren Studie (91) wurde gezeigt, dass es bei Füllungsmaterialien, die ZnO NP enthielten, zu einer verringerten Biofilmbildung kam im Vergleich zu Materialien ohne ZnO NP.

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die antibakteriellen Eigenschaften von ZnO NP sind noch nicht vollständig geklärt, aber es wurden schon verschiedene Modelle in der Literatur (66,86,92,93) vorgestellt, die im Folgenden besprochen werden.

Zum einen interagieren ZnO NP direkt mit der Zellwand der Bakterien, vor allem bei hohen Konzentrationen an ZnO NP waren Schäden an der Zellwand von *Escherichia coli* (*E. Coli*) festzustellen (94). Es wurden mehrere Mechanismen dafür vorgeschlagen, wie die Integrität von Zellwand und -membran der Bakterien beeinträchtigt werden kann. Zum einen kann dies durch eine Art direkten Kontakt mit der Zellwand geschehen, da man an der Oberfläche der ZnO NP oftmals scharfe Ecken oder Rauigkeiten vorgefunden hat, die beträchtliche Schäden auch an der Zellmembran verursachen können (95). Zum anderen gibt es indirekte Mechanismen wie die Produktion von ROS in nächster Nähe der Bakterien (95) oder der Aufbau einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Zellwand und Metalloxid-NP (86,96). In *E. coli* wurde außerdem gezeigt, dass bei solchen Interaktionen meist auch die Zellintegrität zerstört wird, wodurch sich die ZnO NP im Zellinneren ansammeln können und Zellinhalt austreten kann, was schließlich zur Hemmung des Bakterienwachstums führt (97).

Zn^{2+}-Ionen sind eine weitere Ursache für die antimikrobielle Aktivität von ZnO NP. Sie stören unter anderem den Aminosäuremetabolismus und aktive Transportmechanismen (86). Nach Pasquet et al. (98) ist die Freisetzung von Zn^{2+}-Ionen abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der ZnO NP wie z. B. ihrer Porosität, Morphologie, Größe und Konzentration und außerdem der chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums, seinem pH-Wert und anderer Faktoren, wie Einwirkungszeit der NP und UV-Strahlung. Auch tragen Proteine zur Zersetzung der ZnO NP bei, indem sie Peptide an Zink binden (98).

Einer der wichtigsten zytotoxischen Mechanismen von NP, die auch antimikrobiell wirken, ist die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (97,99–101) und auch bei ZnO NP ist sie einer der Hauptgründe für deren Zytotoxizität (95,102–104). Jedoch sind noch nicht alle Aspekte der ROS-vermittelten antimikrobiellen Wirkung von NP geklärt, und manche Bakterien wie *Staphylococcus aureus* haben Mechanismen entwickelt, um sich dagegen zu verteidigen (105). Auch wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit NP (hier aus ZnO, TiO_2 und SiO_2) unter Lichteinstrahlung das Wachstum von Bakterien stärker hemmt als ohne, was sich mit dem photokatalytischen Effekt erklären lässt (99). ZnO, TiO_2 und SiO_2 sind Materialien, die auch in der Halbleitertechnik verwendet werden. Solche Materialien kennzeichnet unter anderem eine Lücke zwischen dem Leitungs- und dem Valenzband, die bei ZnO ca. 3,3 eV beträgt. Der photokatalytische Effekt beschreibt das Phänomen, dass die Photonen der UV-Strahlung die Elektronen vom Valenzband dazu bringen, sich zum Leitungsband zu bewegen. Dadurch entstehen positive Lücken am Valenzband, die als direktes Oxidationsmittel reaktive Hydroxylradikale erzeugen (86). Auf diesen Effekt aufbauend wurden Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten gefunden, die photo- und die sonodynamische Therapie. Diese werden in Kapitel 2.2.3 genauer vorgestellt. Ebenso ist dort der photokatalytische Effekt in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Es wurde jedoch auch schon eine antibakterielle Wirkung ohne direkte Sonnenlichteinstrahlung bei ZnO NP nachgewiesen, die mit der Produktion von ROS, genauer dem Superoxid-Anion (oder Hyperoxid-Anion $O_2^{\bullet-}$), zusammenhing (106). Der genaue Mechanismus dieser UV-unabhängigen ROS-Produktion ist allerdings noch ungeklärt (86).

Die Größe und chemische Zusammensetzung von NP bestimmen nicht nur deren physikalisch-chemische Eigenschaften (siehe oben, Kapitel 2.2), sondern sie sind auch von großer Bedeutung für ihre antibakterielle Aktivität. In einer Studie von Jones et al. (107) wurde die Wirkung von ZnO NP mit der anderer NP auf verschiedene Bakterienarten verglichen, und man hat herausgefunden, dass ZnO NP das Wachstum von *S. aureus* signifikant besser (≥ 50 %) hemmen kann als andere getestete NP. Die gleiche Studie hat außerdem den Einfluss der Größe der NP getestet, mit dem Ergebnis, dass kleinere ZnO NP (*Ø* von ca. 8 nm) mit einer Konzentration von 1 mM das Wachstum von *S. aureus* um ca. 99 % reduziert haben, während größere ZnO NP (*Ø* von ca. 50-70 nm) trotz einer höheren Konzentration (5 mM) nur zu einer Reduktion auf 40-50 % in der Lage waren. Zu diesem Ergebnis, dass die antimikrobielle Wirkung mit kleinerer NP-Größe zunimmt, kamen auch etliche andere Studien, die sich entweder auch mit ZnO NP (90,91,98) oder mit Palladium NP (108) beschäftigten. Bei letzteren wurde jedoch auch gezeigt (108), dass Größenunterschiede auf einer kleineren Skala (± 0,5 nm) auch wieder die umgekehrte Tendenz zeigen können.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der antimikrobiellen Wirkung ist die Konzentration der NP. Es wurde gezeigt, dass die antimikrobielle Wirkung umso größer ist, je höher die Konzentration der NP ist (94,102). Des Weiteren hatte der Faktor Konzentration der NP in einer Studie (94) einen größeren Einfluss auf den bakteriostatischen Effekt als der Faktor Größe. Auch kann die Form der NP die antimikrobielle Aktivität beeinflussen: So wurde herausgefunden, dass ZnO NP in Form einer Blume eine höhere photokatalytische Aktivität haben und deswegen wirksamer gegen Bakterien sind als Stangen- und Kugelformen (109). Ebenso kann man die ROS-Produktion erhöhen, indem man über Modifikationen an der ZnO-Oberfläche (*oxygen annealing*) die dort vorhandene Anzahl der Sauerstoffatome erhöht, was dann wiederum das Bakterienwachstum stärker hemmt (110).

Die antimykotische Aktivität von ZnO NP wurde zwar weniger eingehend untersucht als die antibakterielle, aber sie konnte auch schon durch einige Studien bestätigt werden (111–113). Genau wie bei Bakterien ist die Wirkung von der Größe der NP abhängig, sodass kleinere Partikel den größeren Effekt zeigen (111). In gleicher Weise wurde auch gezeigt, dass die antimykotische Wirkung umso stärker ist, je höher die Konzentration an ZnO NP ist (112,113), beispielsweise auf den Hefepilz *Candida albicans*, der häufig in der Mundhöhle

auftritt (114). In letzterer Studie (114) wurde zudem gezielt der Wirkmechanismus von ROS getestet, indem man einerseits Histidin, welches die Aktivität von Hydroxylradikalen und von Singulett-Sauerstoff hemmt, und andererseits sichtbares Licht eingesetzt hat. Die Ergebnisse lassen die Bedeutung von ROS bei der antimykotischen Wirkung von ZnO NP erkennen, da bei der höchsten Histidin-Konzentration die antimykotische Wirkung nicht mehr festzustellen war und das sichtbare Licht die Wirkung der ZnO NP verstärkt hat. Ferner konnte bei – durch sichtbares Licht – photoaktivierten ZnO NP auch eine Verstärkung der Wirkung gegen das Pflanzenpathogen *Botrytis cinerea* beobachtet werden (113).

2.2.2 Zytotoxizität von ZnO NP auf humane Zellen und selektive Toxizität

Aufgrund ihrer vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten werden ZnO NP schon in vielen biomedizinischen Bereichen angewendet oder werden daraufhin untersucht. Eine Zusammenfassung von Wirkmechanismen und möglichen Anwendungen von ZnO NP bietet der Review-Artikel von Wiesmann et al. (92). ZnO NP können in der Krebstherapie, gegen Mikroorganismen, gegen Diabetes, als entzündungshemmendes Mittel, wegen ihrer gelben oder grünen Lumineszenz als Mittel bei bildgebenden Verfahren in der Diagnostik, aber auch an Zellen wie z. B. in der Pathologie angewendet werden (115). Auf manche dieser vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten wird in Kapitel 2.2.3 genauer eingegangen. Jedoch sind aufgrund dieses großen Verwendungsspektrums die Bedenken gegenüber der Toxizität von ZnO NP im menschlichen Körper auch mehr in den Fokus der Forschung gekommen.

Die genauen Mechanismen der Toxizität von ZnO NP gegenüber Zellen von Säugetieren sind hingegen noch nicht vollständig geklärt. Man konnte *in vitro* als Folge von ZnO-NP-Exposition (für ZnO NP < 100 nm) Zytotoxizität und Genotoxizität sowie die Einleitung der Apoptose feststellen (116). Es gibt zudem unterschiedliche Wege, wie NP in den Körper aufgenommen bzw. dann dort verteilt werden. Sie können über den respiratorischen Trakt (117), das Verdauungssystem, und über parenterale Wege in den Körper eindringen und sich dann dort verteilen. Sie wurden nach Zirkulation im Körper nach Ablagerungen in der Leber, der Milz, der Lunge, den Nieren und manchmal auch im Herzen nachgewiesen (118). Sie zeigten in einem *in-vivo*-Experiment mit

Ratten eine deutliche Wirkung besonders nach Aufnahme über die Atemwege (Inhalation) oder über eine intratracheale Tropfinfusion mit der Folge von Lungenentzündung, die jedoch nach einigen Tagen wieder abklang. Die grippeähnlichen Symptome waren ähnlich derer von Menschen, die in der Metallverarbeitung arbeiten (Metalldampffieber). Jedoch zeigten dieselben ZnO NP *in vitro* fast keine Anzeichen von Zytotoxizität, sodass diese Ergebnisse nicht vergleichbar mit den *in-vivo*-Versuchen waren (119). Über die Nasenschleimhaut wurden bei Ratten vor allem kleinere (20 nm) statt größere (1000 nm) ZnO NP (120) aus Latex aufgenommen. Sie konnten zudem schon nach 5 min nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration, die bei den kleinsten Partikeln 3,25 % der verabreichten Menge entsprach, erreichten sie nach 60 min, diese blieb dann für 2 h konstant. Bei mit Chitosan umhüllten NP wurde der Höchstwert schon nach 15 min gemessen. Beide Versuche zeigen deutlich die Durchlässigkeit der Nasenschleimhaut für kleinere NP (120).

Auch *in-vitro*-Versuche konnten die toxischen Effekte von NP bei einer bronchialen Epithelzelllinie (BEAS-2B) (121) und auch einer Tumorzelllinie eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (A549, wurde auch für diese Arbeit verwendet, siehe Kapitel 3.1.1) (122) nachweisen. Die Anwendung von ZnO NP resultierte dort in Zytotoxizität, in erhöhtem oxidativen Stress, einem Verlust der Integrität der Zellmembran, in erhöhter intrazellulärer Calcium-Konzentration, herabgesetztem mitochondrialen Membranpotential, erhöhter Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität und Interleukin (IL)-8-Produktion (121,122). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass die Toxizität der ZnO NP durch eine Umhüllung herabgesetzt werden kann (122), wahrscheinlich beruhend darauf, dass die ZnO NP in diesem Zustand weniger direkt mit den Zellen interagieren und weniger Zn^{2+}-Ionen freisetzen können (116).

Als Mechanismen für die Toxizität werden ähnliche vermutet, wie sie für Bakterien bereits in Kapitel 2.2.1 dargestellt wurden: zum einen die Freisetzung von Zn^{2+}-Ionen, die man für Entzündungsreaktionen und Nekrose verantwortlich macht (123). Auch in einer anderen Studie (124) wurde dies vermutet, da im Zellkulturmedium die Freisetzung von Zn^{2+}-Ionen bei ZnO NP (hier < 100 nm) höher war als bei ZnO-Pulver, dessen gebildeten Aggregate durchschnittlich eine Größe von 11,5 µm hatten, während die ZnO NP-Aggregate durchschnittlich nur 353 nm groß waren. Zum anderen lösen NP, wahrscheinlich wegen der spezifischen Oberfläche der einzelnen NP und deren Reaktivität, auch

Entzündungsreaktionen durch höhere Ausschüttung von Zytokinen wie IL-8 aus (123,124). Des Weiteren wurde auch der Einfluss von Größe und Form der NP beobachtet (66), z. B. sind stäbchenförmige ZnO NP zwar nach 12 h gleich toxisch wie kugelförmige waren, nach 24 h waren jedoch die stäbchenförmigen toxischer (125). Die Produktion von ROS spielt auch in Zellen von Säugetieren eine große Rolle bei den Wirkmechanismen von ZnO NP (126). In einer Studie von Fukui et al. (127) wurde eine Korrelation von erhöhten intrazellulären Zn^{2+}-Ionen mit einem ebenfalls hohen Vorkommen von ROS und damit zusammenhängend der Apoptose der Zellen gefunden. Um die grundlegenden Eigenschaften der ZnO NP beizubehalten, aber die Toxizität zu reduzieren, wurden schon verschiedene Arten von Umhüllungen getestet. Als Beispiele sind hier Aminopropyltriethoxysilane (APTES), Silica (SiO_2) und Polyethylenglycole (PEG) zu nennen. Bei einer Hülle aus APTES ist vor allem die verbesserte Photostabilität hervorzuheben (128), bei einer aus PEG die Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit (129), die die Zytotoxizität von ZnO NP herabsetzen konnte (130). Dieses Phänomen hat man mit einer verminderten Endozytoserate der NP erklärt, da diese von der Oberfläche der NP abhängt (131). Eine Silicahülle kann die Agglomeration der NP reduzieren (132), aber ihre Toxizität ist ähnlich der von unbeschichteten NP (133). Wiesmann et al. (72) konnten zudem zeigen, dass die Zytotoxizität von ZnO NP mit Silicahülle im Vergleich zu solchen ohne Hülle lediglich verzögert war. Nach 4 h zeigten in dieser Studie nur die ZnO NP ohne Hülle toxische Effekte, nach 6 h zeigten auch die Silica-umhüllten NP eine Wirkung und nach 24 h hatten beide die gleiche Toxizität.

Ein weiteres interessantes Phänomen bei menschlichen Zellen konnte insofern beobachtet werden, als ZnO NP manchmal auf Tumorzellen zytotoxisch zu wirken scheinen, auf normale Zellen jedoch nicht, ergo in einem gewissen Maß eine selektive Toxizität vorlag. Das wurde schon in unterschiedlichen Studien mit mehreren Zelltypen festgestellt. Hanley et al. (134) haben normale T-Zellen mit Tumorzelllinien (Jurkat, Hut-78) verglichen, mit dem Ergebnis, dass die Tumorzellen 28-35 mal so sensibel auf ZnO NP reagieren wie die normalen, nicht aktivierten T-Zellen. In einer anderen Studie (135) wurden Glioma-Zelllinien (A172, U87, LNZ308, LN18, LN229) mit normalen Astrozyten verglichen, wo auch zu sehen war, dass sogar bei der höchsten getesteten Konzentration an ZnO NP (10 mmol/L ZnO NP für 24 und 72 h) bei den normalen Astrozyten kein zytotoxischer Effekt zu sehen war, bei allen Tumorzelllinien dagegen war ein

signifikanter Effekt zu sehen. Die gleichen Autoren konnten diesen selektiv-zytotoxischen Effekt zudem sowohl bei Brustkrebs (Brustkrebszelllinie MCF-7 im Vergleich mit Zelllinie MCF-10A aus normalen Brustzellen) als auch bei Prostatakrebs (Prostatakrebszelllinie PC-3 im Vergleich mit Zelllinie RWPE-1 aus normalen Prostatazellen) zeigen (135). In einer anderen Studie (136) wurde eine Leukämie-Zelllinie (HL60) mit gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes wie Lymphozyten oder Monozyten verglichen. Hier zeigte auch die Tumorzelllinie eine signifikant höhere Sensitivität auf ZnO NP, wobei bei gleichem Versuchsaufbau, aber mit nicht-nanopartikulärem ZnO (*bulk ZnO*) keine Zytotoxizität gegenüber den HL60-Zellen zu sehen war (136). Wieder eine andere Studie (72) hat die Tumorzelllinie A549 mit gesunden Fibroblasten verglichen. Hier war für eine Konzentration von 50 µg/ml nach 12 h die Zellviabilität der Tumorzellen um 70 % reduziert, während bei den Fibroblasten keine Toxizität zu sehen war (72). Ähnliche Ergebnisse konnten Shandiz et al. (137) zeigen, die eine Nierenzelllinie (HEK293) und zwei Brustkrebszellen (MCF-7, T47D) nach einer Behandlung mit ZnO NP verglichen und auch hier annähernd nur die Zellen der Tumorzelllinien Schaden davontrugen.
Eine mögliche Erklärung liegt in der unterschiedlichen ROS-Produktion der normalen Zellen und Krebszellen, da von Hanley et al. (134) herausgefunden wurde, dass die Tumorzelllinie nach Kontakt mit ZnO NP mehr ROS produzieren als die primären T-Zellen, was an ihrer höheren Proliferationsrate liegen könnte. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass auch die selektive Toxizität von ZnO NP sich mehr bei schnell proliferierenden Zellen zeigt als bei differenzierten Zellen, z.B. bei ruhenden Osteozyten (138) oder T-Zellen (134). Deshalb konkludierten Taccola et al. (138), dass ZnO NP gegen alle schnell proliferierenden Zellen, maligne oder benigne, selektive zytotoxische Effekte zeigen.

2.2.3 Verwendungsmöglichkeiten von ZnO NP in der Tumortherapie

Die vielfältigen potenziellen Anwendungsmöglichkeiten zeigen, dass ZnO NP sowohl zusätzlich zu den klassischen Säulen der Tumortherapie – Chirurgie, Bestrahlung, Chemotherapie – als tumorbekämpfendes Mittel eingesetzt werden könnten, als auch als Haupttherapeutikum in ganz neuen Verfahren. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ZnO NP alleine dosisabhängig zytotoxisch auf eine Tumorzelllinie der Epidermis (A431) wirkten, indem sie die Zellen durch

oxidativen Stress dazu brachten, die Apoptose einzuleiten (139). Ebenso wurden sie als ergänzendes Mittel zur konventionellen Therapie untersucht, und zwar wurden ZnO NP schon *in vitro* im Zusammenhang mit Bestrahlung untersucht. Hier konnten Generalov et al. (140) zeigen, dass 80-100 nm große ZnO NP mit Silicahülle den Effekt ionisierender Strahlung signifikant verstärken können. Sie verwendeten verschiedene Dosen an Röntgenstrahlung (2, 4, 7 und 10 Gray (Gy)) und eine Konzentration an NP, die allein angewendet, eine Zytotoxizität von 20 % nicht überschreiten sollte. Dies wurde anhand zuvor durchgeführter Experimente sichergestellt. Sie konnten mit diesem Versuchsaufbau zeigen, dass die ZnO NP den Effekt der Bestrahlung für die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP um das Zweifache und für Du145 um das 1,5-Fache verstärken konnten. Auch in Zusammenhang mit Bestrahlung konnten Wiesmann et al. (141) zeigen, dass manche Zellen der untersuchten Tumorzelllinien (A549 und HuH-7) nach einer Bestrahlung mit 16 Gy in ein seneszentes Stadium übergingen, sie also durch Pausieren des Zellzyklus in einen Ruhezustand übergingen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Zellen nach einiger Zeit wieder normal proliferieren konnten, was die Autoren als mögliche Erklärung für das Auftreten von Metastasen und die daraus folgende Resistenz gegen die Bestrahlungstherapie sehen. Jedoch konnten die verwendeten ZnO NP gezielt diese seneszenten Zellen eliminieren, was deutlich ihr Potential in der Tumortherapie unterstreicht (141). In einer anderen Studie (142) wurden die 9 nm großen ZnO NP mit den Elementen Europium (Eu) und Gadolinium (Gd) dotiert. Das sollte die Absorption der ionisierenden Strahlung verstärken und damit die ROS-Produktion verstärken, die dann mittels DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) gemessen wurde. Es wurden drei verschiedene Strahlungsquellen verglichen, UV-, gamma (γ)- und Röntgenstrahlung. Während die reinen ZnO NP ohne die zusätzlichen Elemente bei der UV-Strahlung die höchsten Werte der ROS-Produktion erkennen ließen, was sich die Autoren mit dem photokatalytischen Effekt erklärten (siehe Kapitel 2.2.1), produzierten die dotierten ZnO NP bei γ-Strahlung auch bei den niedrigen NP-Konzentrationen mehr ROS als die reinen ZnO NP. Deutlich die höchste ROS-Produktion zeigten die dotierten NP aber bei den Röntgenstrahlen, hier erreichten die mit Gd dotierten die insgesamt höchste ROS-Produktion, die mit Eu dotierten bei höheren Konzentrationen auch noch mehr als die reinen ZnO. Das ist auch vielversprechend für den Einsatz am Patienten, da die UV-Strahlung nicht so tief

ins Gewebe eindringen kann wie die γ- oder Röntgenstrahlung und man diese NP mit den letzteren Strahlungsarten auch in tiefer gelegenen Gewebeschichten einsetzen könnte (142). In einer weiteren Studie (143) wurde gezeigt, dass die Kombination aus ZnO NP und Kaffeesäure sowohl *in vitro* (MCF-7- und HepG2-Zelllinien) als auch *in vivo* tumorzellbekämpfende Eigenschaften aufwies und sich nach Bestrahlung (γ-Strahlung) der Mäuse diese Wirkung verstärkte.
Aufgrund der besonderen und vielfältigen Eigenschaften von ZnO NP wurden zwei eigenständige Therapiemöglichkeiten für Tumore abseits der konventionellen in Betracht gezogen, die photo- und die sonodynamische Therapie (73). Bei der photodynamischen Therapie (PDT) wird eine lichtaktivierbare Substanz, ein Photosensibilisator, nach Anreicherung im zu therapierenden Gewebe mit einer Lichtquelle bestrahlt, wo dann vor allem ROS gebildet werden, welche toxisch auf das Gewebe wirken. ZnO NP können hier wegen ihres photokatalytischen Effekts gut angewendet werden, da die PDT bereits mit Titandioxid (TiO_2), welches ähnliche Eigenschaften besitzt wie ZnO, getestet wurde. In einer Studie (144) wurden TiO_2 NP mit PEG-Hülle *in vitro* an einlagigen und mehrlagigen (Sphäroiden) Glioma-Zellkulturen (C6-Zelllinie aus Rattengliomazellen) getestet. Bei den einlagigen Zellkulturen gab es einen klaren dosisabhängigen Effekt der UV-Bestrahlung, da die NP alleine auch bei der höchsten Konzentration kaum Toxizität zeigten (90 % Überlebensrate), aber nach 45-minütiger UV-Bestrahlung bei der Hälfte dieser Konzentration sich die Überlebensfraktion der Zellen auf 20 % reduzierte. Bei den dreidimensionalen Sphäroiden aus den gleichen Zellen fiel die Wirkung nicht so deutlich aus, da sie trotz der Bestrahlung – wenn auch ein stark vermindertes im Vergleich zur Kontrollgruppe – Wachstum zeigten. Das erklärten sich die Autoren einerseits mit der verminderten Reichweite von UV-Strahlung in Geweben (s. o.), andererseits konnten durch die hypoxischen Zellen im Zentrum des Sphäroids wahrscheinlich weniger NP in die Zellen gelangen als in den äußeren Schichten. Des Weiteren wurde als Art des Zelltods die Apoptose festgestellt, die ebenso unter hypoxischen Bedingungen verringert wird (144). Wegen dieser geringen Reichweite von oft nur einigen Millimetern ins Gewebe kann die PDT derzeit nur für oberflächliche Läsionen verwendet werden. Eine Lösung dieses Problems könnte die Verwendung von *upconversion nanoparticles* (UCN) sein, diese können niederenergetische Nahinfrarot (NIR)-Strahlung in höherenergetische UV-Strahlung konvertieren. Der Vorteil daran ist, dass NIR-Strahlung (in der

Medizin gebräuchlich: 700-1100 nm) auch in tiefere Gewebeschichten eindringen kann und somit auch dort Tumore erreichen kann. Das wurde an einer *in-vivo*-Studie an Mäusen gezeigt, bei der das Tumorwachstum mittels der PDT im Vergleich zu den Kontrollgruppen (keine Behandlung sowie NP und NIR-Strahlung alleine) sichtlich reduziert werden konnte. Jedoch konnte nach dieser einmaligen Dosis der Tumor nicht gänzlich aufgehalten werden, weswegen die Autoren für weitere Studien Wiederholungen der Dosis nach Wiederaufnahme des Tumorwachstums nach 2 Wochen vorschlugen (145).
Die andere erwähnte neue Therapieform ist die sonodynamische Therapie (SDT), bei der ein applizierter Sensibilisator (hier NP) durch Ultraschall (US)-Wellen angeregt wird und so, wie bei der PDT, dort mittels ROS-Produktion toxisch auf das Gewebe wirkt. Beide Mechanismen sind in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Der entscheidende Vorteil der SDT gegenüber der PDT ist die größere Reichweite von US-Wellen gegenüber UV- oder NIR-Strahlung im Gewebe (73). Harada et al. (146) untersuchten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Auswirkungen von TiO_2 NP in Kombination mit US auf eine C32-Melanomazelllinie. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass die alleinige Behandlung mit NP oder US sich nicht signifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe unterschied in Bezug auf die Prozentzahl an apoptotischen Zellen. Die Kombination von TiO_2 zusammen mit US erhöhte den Prozentsatz der apoptotischen Zellen hingegen um das 2,73-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch der *in-vivo*-Versuch mit Mäusen, die einen implantierten Tumor der gleichen Zelllinie erhielten, konnte zeigen, dass die Kombination aus NP und US das Tumorwachstum signifikant hemmen konnte im Vergleich zu sowohl der unbehandelten als auch der jeweils nur mit NP oder nur mit US behandelten Gruppe. Die SDT wurde *in vitro* ebenfalls schon an HNSCC (HSC-2-Zellen) getestet, wo ein klarer dosisabhängiger Effekt zu erkennen war. Im Vergleich zu den nur mit US behandelten Zellen, wo sich die Zellviabilität nur geringfügig reduzierte, konnte bei der Gruppe mit US und TiO_2 NP bei der höchsten US-Intensität (73 W cm^{-2}) die Zellviabilität um mehr als die Hälfte reduziert werden (147). Im Vergleich mit PDT haben Yamaguchi et al. (148) beim Testen beider Verfahren an einer Glioblastomzelllinie (U251) einige interessante Unterschiede gefunden. Zum einen zeigte sich die Wirkung von PDT erst nach 20 min der UV-Bestrahlung, während bei der SDT die Überlebensrate der Zellen fast proportional zur Dauer der US-Behandlung abnahm. Zum anderen hat man

den Einfluss von ROS bei beiden Therapiearten untersucht, indem man Glutathion, ein in allen Zellen im Körper vorkommendes Antioxidans, hinzuzog. Dadurch konnte man sehen, dass die Aktivität der PDT durch Glutathion gehemmt wurde, während die SDT nahezu ungehindert das Überleben der Zellen reduzierte. Deswegen wurden andere Toxizitätsmechanismen neben der Entstehung von ROS in Betracht gezogen, die vor allem die Zellmembran schädigen. Dazu gehört der Mechanismus der Kavitation, also die hier durch US angeregte Bildung von Bläschen, deren Platzen dann sowohl die NP zur ROS-Produktion anregt, als auch die Integrität der Zellmembran zerstören kann.

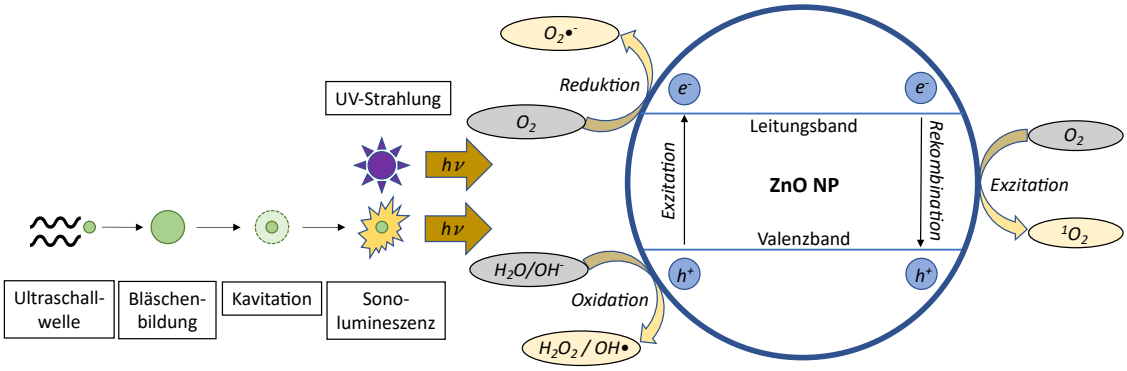


Abbildung 5: Mechanismus der PDT und SDT sowie des photokatalytischen Effekts

Auf der Oberfläche von ZnO oder TiO_2 NP (rechts im Bild) entstehen ROS nach Anregung mit UV- oder US-Wellen. NP aus Halbleitermaterialien können direkt durch UV-Strahlung angeregt werden. US-Wellen erzeugen in einem wässrigen Milieu Bläschen, deren Platzen (Effekt der Kavitation) dann eine Sonolumineszenz auslöst, also kurze, hochenergetische Lichtsignale aussendet. Angeregt durch diese zwei Mechanismen, kann sich ein Elektron vom Valenzband zum Leitungsband bewegen und hinterlässt dort eine positive Lücke. Jetzt können zwei Arten von Reaktionen folgen: Einerseits können die Elektronen und die positiven Lücken mit nahegelegenen Molekülen (O_2, H_2O, OH^-) reagieren und so ROS (O_2•⁻, H_2O_2, OH•) erzeugen. Andererseits kann die Rekombination von einem Elektron und einer positiven Lücke ein Photon generieren, das Sauerstoff (O_2) in seinen angeregten Zustand, also einen Singulett-Sauerstoff, versetzen kann.
Verändert nach Bogdan et al., 2017 (73)

Der Prozess, die NP erfolgreich und im besten Falle ohne Anreicherung in anderen Körpergeweben in das Tumorgewebe einzubringen (*targeted therapy*), ist derzeit noch nicht ausreichend umsetzbar und es bedarf hier noch weiterer

Forschung. Die Aufnahme in den Tumor kann auf zwei Arten geschehen, einerseits auf passive (*passive targeting*), andererseits auf aktive Weise (*active targeting*). Ein in der Literatur vorgestellter Effekt des *passive targetings* ist der sogenannte *enhanced permeability and retention effect* (EPR-Effekt). Dieser beschreibt die leichtere Durchgängigkeit der Tumorblutgefäße für kleine Moleküle. Das liegt an Besonderheiten in deren Aufbau, da es dort Lücken in unterschiedlicher Größe von 10-1000 nm im Endothel geben kann, die zurückzuführen sind auf eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Endothelzellen, einer Schädigung der ihnen aufliegenden Pericyten und eine abnormale Bildung der Basalmembran. Dadurch, dass sich im Tumor keine oder nicht funktionierende lymphatische Gefäße befinden, gibt es keinen adäquaten Abfluss. Dies führt dazu, dass Stoffe wie NP, die einerseits leicht in den Tumor eindringen, andererseits noch dazu erschwert wieder abtransportiert werden können (149). Der EPR-Effekt wurde bereits 1986 erstmals von Matsumura und Maeda (150) beschrieben. Jedoch musste man feststellen, dass der Effekt im Menschen teils nicht das gleiche gewünschte Ergebnis liefert, wie bei *in-vivo*-Versuchen (151). Trotzdem gibt es einige Nanotherapeutika, die auf dem EPR-Effekt basieren, das erste Medikament – Doxil® oder Caelyx® (etwa 100 nm großes Doxorubicin verkapselt in PEGylierte Liposomen) – kam bereits 1995 in den USA auf den Markt, woraufhin andere, mit länderspezifischen Zulassungen folgten (152).

Das *active targeting* bezieht sich darauf, dass die NP durch Modifizierungen ihrer Oberfläche gezielt zum Tumor transportiert werden und nur dort aufgenommen werden sollen. So kann man die Oberfläche der NP mit Liganden wie Antikörpern, Aptameren, Proteinen, Peptiden und Kohlenhydraten ausstatten, die speziell an Rezeptoren auf der Tumoroberfläche binden, wovon man sich dann eine erhöhte Aufnahme in den Tumor verspricht (153). Eine weitere wichtige Rolle neben den Tumorrezeptoren spielt die Extrazellularmatrix des Tumors und der pH-Wert der Tumorumgebung, der meist etwas niedriger ist als in normalen Geweben, er liegt zwischen 6,5 und 7,2 (der pH-Wert des arteriellen Blutes zum Vergleich liegt bei 7,35-7,45). Diese beiden Faktoren unterscheiden sich, anders als die Rezeptoren, nicht so stark über die verschiedenen Tumortypen hinweg, was sie unter anderem auch als Ziele der NP ebenfalls attraktiv macht (152,153). Die Ziele in der Extrazellularmatrix des Tumors können

damit auch assoziierte Zellen sein, wie tumorassoziierte Makrophagen, Endothelzellen oder Fibroblasten (153).

Zum Erfolg des *active targeting* gibt es gegensätzliche Ergebnisse, während manche präklinische und klinische Studien davon berichten, das erfolgreiche Auffinden und die Bindung der NP an die Rezeptoren erhöhe die Penetration im Tumor und die Effizienz des Medikaments, vermuteten andere Autoren, dass die NP-Bindung zwar die intrazelluläre Akkumulation des Medikaments erhöhe, aber nicht die Verteilung im Tumor und die Effizienz des Medikaments (152).

Trotz der großen Menge an *in-vitro*-Studien und *Review*-Artikeln gibt es leider noch sehr wenige NP, die klinisch angewendet werden können. Das liegt unter anderem daran, dass Studien *in vitro*, die oft immortalisierte Zelllinien benutzen, die Gegebenheiten *in vivo* meist nicht in ihrer Komplexität nachahmen können (154). Auch können *in-vivo*-Studien an Tieren oft auch zu anderen Ergebnissen gelangen als letztendlich die Anwendung am Menschen (151). Des Weiteren ist auch die Heterogenität der Tumoren (siehe Kapitel 2.1.1) ein Faktor, welcher es sehr erschwert, die Reaktion der Tumoren auf die NP-Behandlung abzuschätzen und so eine Behandlung für alle HNSCC zu finden, die zu einem erfolgreichen Ergebnis kommt. Ein ähnliches Problem stellen die NP an sich dar, deren Wirkungen ihrerseits oft schwierig einzuschätzen sind, da sie auch aufgrund ihrer Größe zum Teil ganz anders reagieren als vergleichbare nicht-nanopartikuläre Materialien, wie z. B. *bulk ZnO* im Vergleich zu ZnO NP (siehe Kapitel 2.2.2).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen und Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die humanen Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T verwendet, außerdem wurden menschliche Fibroblasten untersucht. A549 ist eine Adenokarzinomzelllinie eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC = *non-small cell lung carcinoma*), deren Zellen 1972 aus dem explantierten Tumor eines 58-jährigen männlichen Patienten isoliert wurden. Da diese Zellen aus dem respiratorischen Epithel hervorgehen, haben sich A549-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung epithelialer Tumore des oberen und unteren Respirationstraktes etabliert. Die Zelllinie stammt aus dem Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

HNSCCUM-02T ist eine Plattenepithelkarzinomzelllinie, die aus dem am Zungengrund gelegenen Primärtumor eines 44-jährigen männlichen Patienten stammt und an der Universitätsmedizin Mainz etabliert wurde (155).

Die primären Fibroblasten (FB3/19, FB4/19a und FB5/19a) wurden im Labor der AG Brieger (Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) aus Gewebeproben von Patienten der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik isoliert und kultiviert.

3.1.2 Zinkoxid-Nanopartikel

Die für diese Arbeit verwendeten Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO NP) mit dem Kürzel MV-114 wurden von Melanie Viel aus der AG Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert. Die Synthese erfolgte gemäß der in Wiesmann et al. (2019; (72)) beschriebenen Methode.

Die Größe der ZnO NP, die anhand der Abbildung 6 aus drei Messungen bestimmt wurde, betrug 14,05 nm ± 0,69 nm. Die NP besaßen ein Zeta-Potential von 26,6 mV, das ebenfalls aus drei Messungen bestimmt wurde.

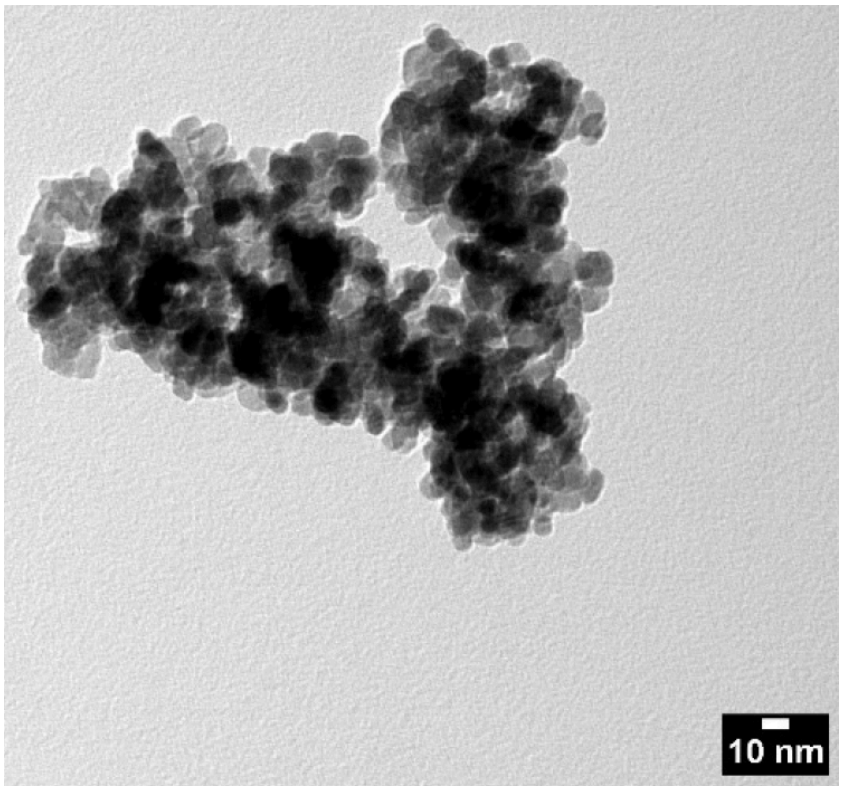


Abbildung 6: ZnO NP MV-114

Aufnahme der verwendeten ZnO NP mittels Transmissionselektronenmikroskopie.
Quelle: Melanie Viel, AG Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Für alle Versuche, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurde die gleiche Charge verwendet. Die Nanopartikel wurden nach der Aliquotierung, die in Kapitel 3.2.2.1 genauer beschrieben wird, luftdicht verschlossen und bei 8 ºC gelagert.

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.
Die hier aufgeführten Chemikalien wurden in pA-Qualität von den genannten Firmen bezogen.

Chemikalien	**Bezugsfirma**
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Amphotericin	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Aqua ad iniectabilia, 50 ml (hochreines Wasser)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovine Calf Serum (FCS), *Iron Supplemented*	VWR Life Science Seradigm, Radnor, PA, USA (Avantor, Radnor, PA, USA)
CASYton	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen
Dimethylsulfoxid (DMSO; Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMEM/F-12 (1:1) (1x)	Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Ethanol (Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Protease	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Sterillium® classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Trypsin-EDTA (TE; 10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Venor®GeM Classic (Mycoplasmen-Detektionsset)	Minerva Biolabs®, Berlin

3.1.4 Lösungen und Zellkulturmedien

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Zellkulturmedien sowie deren Zusammensetzung. Die hier erwähnten Lösungen wurden für diese Arbeit in den angegebenen Konzentrationen hergestellt.

Name	Zusammensetzung
Einfrierlösung zur Kryokonservierung	10 % DMSO mit FCS
Färbelösung für Fibroblasten	12 % Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung mit Aqua dest.
Färbelösung für Tumorzelllinien	10 % Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung mit Aqua dest.
Fixierlösung	Ethanol/Aceton 1:1
Kulturmedium für Fibroblasten-Primärkultur	DMEM/F-12 (1:1) (1x) 10 % FCS 0,1 % Amphotericin 2 % P/S
Kulturmedium für Fibroblasten	DMEM/F-12 (1:1) (1x) 10 % FCS 2 % P/S
Kulturmedium für Tumorzelllinien	DMEM/F-12 (1:1) (1x) 5 % FCS 2 % P/S
Lösung zum Ablösen von Zellen (siehe Kapitel 3.2.1)	1x Trypsin-EDTA (TE) aus 10x TE mit DPBS
Protease 0,5 %	Protease P6141 in DPBS

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Die hier angegebenen Verbrauchsmaterialien wurden zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit verwendet.

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
CASYcups	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen

Einwegglaspasteurpipetten, autoklaviert	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA (Avantor, Radnor, PA, USA)
Einwegpasteurpipetten, unsteril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einwegskalpell (*Feather Disposable Scalpel*)	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Eppendorfgefäße, *Safe-Lock-Tubes* o 0,5 ml o 1,5 ml o 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen: cellstar® Polypropylen Röhrchen o 15 ml o 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
Faltenfilter (Ø 150 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel (Whatman plc, Kent, UK; GE Healthcare, Chicago, IL, USA)
Kryotubes Cryo.s™	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
Multipette® plus mit Aufsätzen: Combitips® advanced 50ml	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
Pipettenspitzen o 100 µl o 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
serologische Pipetten mit Spitze cellstar®, steril o 2 ml o 5 ml o 10 ml o 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich

Spritzenvorsatzfilter (Whatman® FPº30/0.2 CA-S	GE Healthcare Europe GmbH, Freising
Zellkulturflaschen cellstar® mit Sterilfilter, steril ○ 25 cm^2 ○ 75 cm^2 ○ 175 cm^2	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
Zellschaber (1,8 cm Klinge), steril	Falcon (Corning Incorporated), Corning, NY, USA
Zellsieb (EASYstrainer™; 70 µm), steril	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
96-Well-Platte: cellstar® Microplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich

3.1.6 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte und deren Bezugsfirmen.
Die hier dargestellten Geräte wurden zur Durchführung dieser Arbeit verwendet.

Gerät	**Bezugsfirma**
Bestrahlungsanlage Gammacell 2000 Nuklid: Cs-137	Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark
Brutschrank Heracell 150i CO_2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CASY® Cell Counter & Analyzer	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen
Gefrierschrank (-80 ºC)	Kendro Laboratory Products, Langenselbold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Laborabzug nach DIN 12924	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim

Mikroskop	Leitz (Leica Microsystems, Wetzlar)
Mikroskop Nikon TMS *Inverted Phase Contrast Microscope*	Nikon, Düsseldorf
serologische Pipette pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
sterile Werkbank Flow Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stickstofftank	CRYO-4000, Chart Ind., Burnsville, MN, USA
Thermoschüttler TM 130-6	HLC – Haep Labor Consult, Bovenden
Transilluminator TMW-20	UVP, Upland, CA, USA (Analytik Jena AG, Jena)
Ultraschall-Reinigungsgerät Emmi® 40HC	EMAG AG, Mörfelden-Walldorf
Vortex IR	Starlab International GmbH, Hamburg
Vortex Top-Mix 11118 Fisher Brand®	Fisher Scientific GmbH, Schwerte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Waage Kern PCB	Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Zentrifuge Micro Centrifuge Modell: 100 VAC Fisherbrand®	Fisher Scientific, Schwerte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

3.1.7 Software

Tabelle 5: Verwendete Software und deren Herausgeber.
Die hier angegebenen Softwareprogramme wurden in dieser Arbeit entweder zur Durchführung der Experimente oder zur Auswertung der Ergebnisse herangezogen.

Name	Herausgeber
CASY®	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen
CompuSyn	ComboSyn, Inc., Paramus, NJ. 07652 USA (156)
Graphpad Prism	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
IBM SPSS Statistics 25	International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, NY, USA
NIS-Elements Documentation, Imaging Software	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die untersuchten Zelllinien und primären Fibroblasten wurden in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25 cm^2, 75 cm^2 bzw. 175 cm^2 unter sterilen Standardbedingungen (37 ºC und 5%iger CO_2-Atmosphäre) kultiviert. Als Nährmedium für die Tumorzelllinien A549 und HNSCCUM-02T wurde ein mit 5 % FCS und 2 % P/S angereichertes DMEM/F-12-Medium benutzt, für die Fibroblasten wurde dagegen 10 % FCS und auch 2 % P/S verwendet. Zur Isolierung der Fibroblasten aus der Gewebeprobe wurde das oben genannte Nährmedium für Fibroblasten zusätzlich mit 0,1 % Amphotericin versetzt. Die primären Fibroblasten wurden höchstens bis Passage 10 verwendet, die Tumorzelllinien bis höchstens Passage 60. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter einem Lichtmikroskop kontrolliert, auch wurde nach 2-3 Tagen das Nährmedium gewechselt, falls die Zellen nicht passagiert wurden. Außerdem wurde eine Mycoplasmen-Kontamination durch PCR (Venor®GeM Classic, Minerva Biolabs®, Berlin) ausgeschlossen.

Alle mit der Zellkultur zusammenhängenden Vorgänge wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden passagiert, bevor sie eine vollständige Konfluenz erreicht hatten, also bei einer Besiedelung von ca. 80-90 %, um ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen. Dafür wurde das Medium dekantiert und die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, welches daraufhin ebenfalls dekantiert wurde. Zur Ablösung der Zellen wurden 3 ml TE appliziert und die Zellkulturflasche wurde damit für 3 Minuten in den Brutschrank gegeben, um die Zellen daraufhin durch etwas Klopfen leichter ablösen zu können. Sodann wurde die Reaktion mit 7 ml des für den Zelltypen jeweils passenden Nährmediums gestoppt, die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde das Zellpellet mit Medium versetzt und durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurde nun die gewünschte Menge der Zellsuspension mit der zur Größe der Zellkulturflasche passenden Menge an Medium vermischt und in diese ausgesät.

3.2.1.1 Zellzählung

Für die Bestimmung der vorliegenden Zellzahl wurden 30 µl der Zellsuspension entnommen, in einer 96-Well-Platte mit 30 µl 0,4%iger Trypanblaulösung vermischt und in die Neubauer Zählkammer appliziert. Unter Zuhilfenahme der darauf abgebildeten Quadrate wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt, bis eine Zellzahl von mindestens 100 erreicht war.
Zur Berechnung der Gesamtzellzahl diente folgende Formel:

$$Zellzahl = \frac{Anzahl\ gezählte\ Zellen}{Anzahl\ größere\ Quadrate} \times 2 \times 10.000 \times Volumen\ Zellsuspension\ in\ ml$$

3.2.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Um zu verhindern, dass eine Zelllinie bei einer hohen Passage ganz verworfen werden muss, wurden anfangs bei kleinen Passagenzahlen Zellen beiseite genommen und durch Einfrieren konserviert. Dazu wurden die in einer möglichst großen Zellkulturflasche (175 cm^2) herangewachsenen Zellen wie oben beschrieben mit TE abgelöst und die Reaktion mit Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in drei gleiche Teile geteilt, zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten) und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurden mit 1,5 ml einer vorher hergestellten Lösung aus 10 % DMSO und 90 % FCS gut vermischt und in Kryotubes überführt. Diese wurden in einem Einfrierbehälter (CoolCell® SV2; BioCision LLC, Larkspur, CA, USA) in einen -80 °C-Gefrierschrank gegeben. Der Behälter stellte hierbei sicher, dass die Zellen schrittweise mit 1 °C pro Minute heruntergekühlt wurden. Nach 24 Stunden konnten sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zur längeren Aufbewahrung gegeben werden. Um sie bei Bedarf wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff zügig aufgetaut, mit 5 ml vorgewärmtem Medium vermischt und zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden mit einer geeigneten Menge an Medium versetzt und ausgesät.

3.2.1.3 Isolierung der primären Fibroblasten

Die für die Isolation von Fibroblasten verwendeten Gewebeproben entstammten Nasenmuscheln, die Patienten der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der

Universitätsmedizin Mainz im Zuge einer stattfindenden Operation entnommen wurden. Die jeweilige Probe wurde unter der sterilen Werkbank in einer sterilen Petrischale mit zwei Einwegskalpellen durch gegenläufige Bewegungen in ca. 3x3 mm große Stücke zerkleinert. Die Stücke wurden einzeln und nacheinander mit einer Pinzette in drei Falcons mit den Flüssigkeiten Ethanol (70 %), Sterillium und nochmals Ethanol getaucht und darin geschwenkt. Sie wurden dann in ein mit 0,5%iger, sterilfiltrierter Protease vorbereitetes Falconröhrchen gegeben, das waagerecht liegend im Kühlschrank bei 8 ºC über Nacht inkubiert wurde.
Am folgenden Tag (< 24 Stunden später) wurde das Falconröhrchen bei 37 ºC 15 Minuten lang in einem Thermoschüttler geschüttelt, dann wurde der Inhalt unter der sterilen Werkbank auf eine sterile Petrischale entleert. Die Gewebestücke wurden mit zwei Einwegskalpellen durch gegenläufige Bewegungen noch weiter zerkleinert, sodass sie mit einer serologischen Stabpipette aufgenommen und auf ein steriles Zellsieb appliziert werden konnten. Mithilfe eines sterilen Zellschabers wurden die Gewebestücke so durch das Sieb in ein Falconröhrchen (50 ml) überführt und dabei weiter zerkleinert. Sobald keine Flüssigkeit mehr vorhanden war, wurde mehrmals mit DPBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Sieb nahezu leer war. Das Falconröhrchen wurde zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten), der Überstand dekantiert, und die Zellen wurden mit 10 ml des geeigneten Nährmediums gut vermischt und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Durch mehrmaliges Passagieren mit jeweils kurzer T/E-Behandlung erfolgte eine Selektion der Fibroblasten, deren Identität mit einer Antikörperfärbung (*Mouse Anti-Human Fibroblasts Clone* TE-7 *Monoclonal Antibody)* überprüft wurde.

3.2.2 Zinkoxid-Nanopartikel

3.2.2.1 Aliquotierung der Zinkoxid-Nanopartikel

Um für jede Behandlung (siehe nächstes Kapitel: 3.2.2.2) eine neue NP-Suspension herstellen zu können, mussten die ZnO NP in kleineren Mengen auf 500-µl-Eppendorfgefäße verteilt werden. Dazu wurden auf einer Waage (Kern PCB) erst die Eppendorfgefäße gewogen, die Waage tariert, und eine kleine Menge ZnO NP mittels eines Spatels hineingefüllt. Dieses wurde dann erneut gewogen und das Gewicht der ZnO NP in hundertstel mg wurde auf dem Deckel

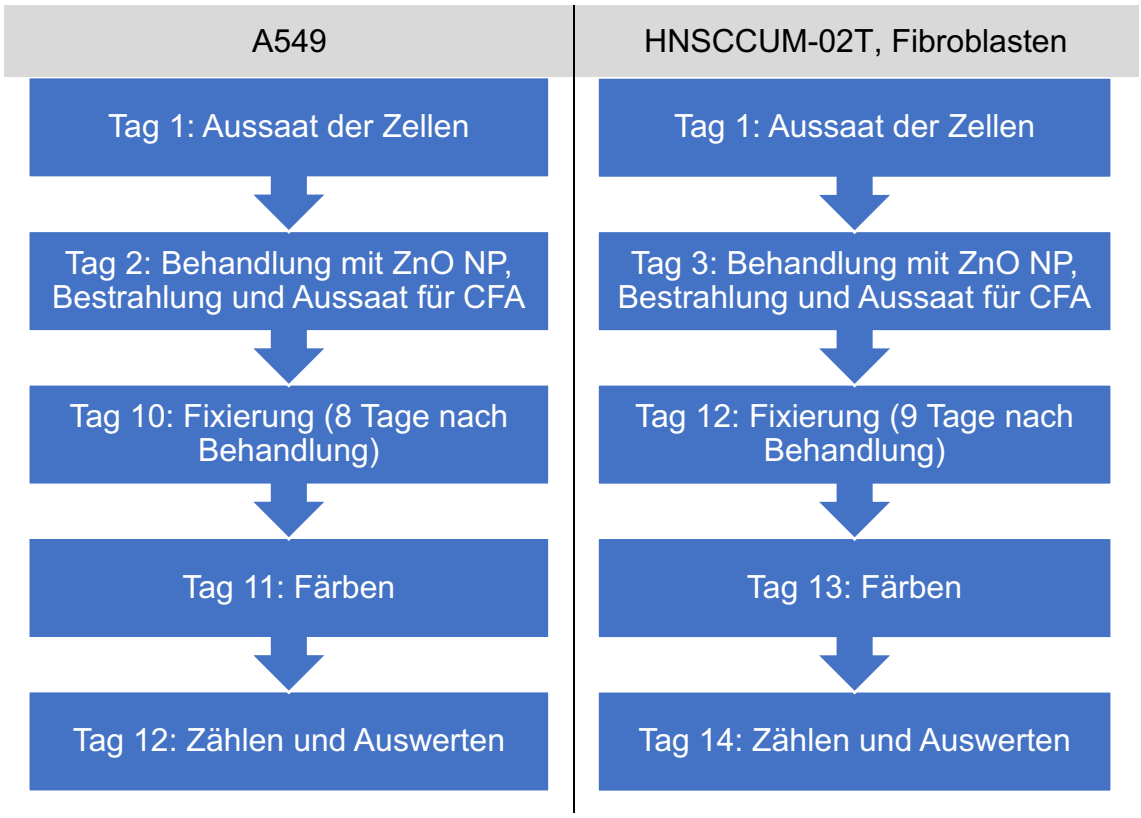
notiert. Diese Zahl entspricht gleichzeitig der Menge an Wasser in µl, die für eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml benötigt wurde.

3.2.2.2 Behandlung von Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln

Die ZnO NP wurden für jede Behandlung neu mit hochreinem Wasser (*Aqua ad iniectabilia*) gemischt (Stocklösung von 10 mg/ml), sodass bei Gabe in die Zellkulturflasche (25 cm^2) mit einem Volumen von 5 ml Medium, eine Konzentration von 20 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml bzw. 100 µg/ml erreicht wurde. Um eine möglichst homogene Suspension der Nanopartikel in Wasser zu erreichen, wurde das Eppendorfgefäß erst 10 Sekunden mit dem Vortex Top Mix 11118 (40 Hz) behandelt, dann für 5 Minuten in ein Ultraschallbad (Emmi® 40HC) bei 45 kHz gelegt und danach nochmals für 10 Sekunden mit dem Vortex IR (1600 rpm) behandelt. Um eine Sedimentation zu verhindern, wurde vor der Gabe in die Zellkulturflaschen auf- und abpipettiert. Die Inkubation mit den ZnO NP erfolgte daraufhin für 4 Stunden im Brutschrank.

3.2.3 Behandlung der Zellen mit ZnO NP und Bestrahlung und anschließendes Koloniebildungsassay

Tabelle 6: Schematische Darstellung des Ablaufs des Colony Formation Assays (CFA). Diese Tabelle gibt einen ersten Überblick über den Versuchsablauf. Dargestellt werden sowohl der zeitliche Ablauf als auch die jeweiligen Arbeitsschritte. In den nachfolgenden Abschnitten wird auf diese noch genauer eingegangen.



Behandlungsablauf an Tag 2 bzw. 3 (identisch für beide Zelllinien und Fibroblasten):

- *9:30 Uhr: Behandlung mit ZnO NP*
- *13:30 Uhr: Zellen ernten, zählen, und Verdünnungsreihe erstellen*
- *15:00 Uhr: Bestrahlung, danach Aussaat*

3.2.3.1 Aussaat der Zellen für die Behandlung

Für die Behandlung mit ZnO NP wurden jeweils fünf Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25 cm^2 ausgesät, für A549-Zellen 24 Stunden vor Behandlung mit 400.000 Zellen pro Flasche und für HNSCCUM-02T und Fibroblasten (FB) 48 Stunden vor Behandlung, bei HNSCCUM-02T mit 500.000 Zellen und bei den FB mit 400.000 Zellen pro Flasche. Es wurde anhand der in den Kapiteln 3.2.1

und 3.2.1.1 geschilderten Methoden geerntet, gezählt und ausgesät. Die Unterschiede sowohl in der Anzahl ausgesäter Zellen als auch der Zeit zwischen Aussaat und Behandlung mit ZnO NP liegen in den jeweils anderen Reaktionen der Zelltypen auf die Behandlung begründet.

3.2.3.2 Behandlung der Zellen mit Zinkoxid-Nanopartikeln

Die Behandlung mit ZnO NP, die Bestrahlung und die Aussaat für das Koloniebildungsassay erfolgte am gleichen Tag. Der Vorgang der Behandlung mit ZnO NP wurde wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt.

3.2.3.3 Ernten der Zellen

Nach 4 Stunden Inkubation der Zellen mit ZnO NP im Brutschrank wurde in allen fünf Zellkulturflaschen (siehe Kapitel 3.2.3.1) das Nährmedium, das die verbleibenden ZnO NP enthielt, mit der Membran-Vakuumpumpe abgesaugt, die Zellen mit 2 ml DPBS gewaschen, welches daraufhin ebenso abgesaugt wurde. Um die Zellen abzulösen, wurden in diesem Schritt 4 ml Accutase appliziert und die Zellkulturflaschen für 5 Minuten in den Brutschrank gegeben. Daraufhin wurde die Reaktion mit 6 ml Nährmedium gestoppt und die fünf Suspensionen in je ein Falconröhrchen überführt.

3.2.3.4 Zählen der Zellen mit CASY® Cell Counter & Analyzer

Von den Zellsuspensionen wurden pro Zellkulturflasche 400 µl entnommen und in fünf vorbereitete CASYcups mit je 10 ml CASYton gegeben. Gemäß der Bedienungsanleitung wurden die richtigen Parameter (Verdünnung, Zelllinie) eingestellt und die Vitalzellzahl bestimmt.

3.2.3.5 Einstellen der geeigneten Zellzahlen für das Koloniebildungsassay

Mit der zugrundeliegenden Vitalzellzahl für jede ZnO NP-Behandlung konnte nun die Verdünnung mit den geeigneten Zellzahlen für jede Kombination mit der nachfolgenden Bestrahlungsdosis errechnet werden. Die Falconröhrchen wurden während der Zellzahlbestimmung zentrifugiert (1500 rpm für 5 Minuten). Der Überschuss wurde dekantiert, und die Zellpellets mit der vorher errechneten Menge an Zellkulturmedium gut vermischt. Die berechneten Konzentrationen

wurden für jede Behandlungskombination in ein Falconröhrchen (15 ml) pipettiert, in welchem später auch die Zellen bestrahlt wurden.

Tabelle 7: Behandlungskombinationen für alle Tumorzellinien sowie Fibroblasten
In dieser Tabelle werden alle Behandlungskombinationen für die Tumorzelllinien (TZL) und Fibroblasten (FB) dargestellt, die in dieser Arbeit angewendet wurden.
TZL = Tumorzelllinie; FB = Fibroblasten

ZnO NP-Konzentration / Bestrahlungsdosis	0 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml
0 Gy	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL
2 Gy	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL
4 Gy	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL, FB	TZL
8 Gy	TZL, FB	TZL	TZL	TZL	TZL

3.2.3.6 Bestrahlung der Zellen

Vor der Bestrahlung (Cs^{137} / γ-Strahlung) wurden alle Falconröhrchen – auch die, welche nicht bestrahlt wurden – in einer Styroporkiste mit Wärmeakkus (37 ºC) verpackt und so transportiert. Dies sollte die Gleichbehandlung aller Proben ermöglichen und sicherstellen, dass etwaige Effekte auf dem Transportweg gleichermaßen auf alle Proben wirkten. Die Falconröhrchen wurden nach dem Schema der Tabelle 7 mit einem Halter in die Bestrahlungsanlage gestellt und gemäß der Bedienungsanleitung bestrahlt. Vor dem Bestrahlen wurden die Falconröhrchen mit dem Halter invertiert, um sicherzustellen, dass die Strahlung auf die Zellen möglichst gleichmäßig wirkte.

3.2.3.7 Aussaat in Zellkulturflaschen für den Koloniebildungsassay

Nach der Bestrahlung wurden die unterschiedlich behandelten Zellsuspensionen in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm^2 pipettiert. Für jede Behandlungskombination wurden dabei zwei Zellkulturflaschen angelegt. Da für diesen Ansatz ein Arbeitsvolumen von 5 ml angenommen wurde, waren in jedem Falconröhrchen 10 ml Zellsuspension, die nach gründlichem Invertieren mit einer Stabpipette aufgenommen und auf zwei Zellkulturflaschen verteilt wurden. Diese wurden wiederum vor der Gabe in den Brutschrank auf die gleiche Art und Weise

bewegt, um ein gleichmäßiges Wachstumsmuster der Kolonien zu erzielen. Die Zellkulturflaschen verblieben nun bei einem Ansatz mit A549-Zellen acht Tage im Brutschrank, bei einem mit HNSCCUM-02T-Zellen oder Fibroblasten jeweils neun Tage.

3.2.3.8 Fixierung der Zellen

Zum Fixieren der Zellen wurde bei der Zelllinie A549 und bei den Fibroblasten folgendermaßen vorgegangen, bei HNSCCUM-02T gab es eine Abweichung, auf die im nächsten Absatz näher eingegangen wird. Das Medium wurde dekantiert, woraufhin die Zellkulturflasche mit Leitungswasser unter dem laufenden Wasserhahn gewaschen und das Wasser ebenfalls verworfen wurde. Es wurden daraufhin ca. 2 ml der vorher hergestellten Fixierlösung (Ethanol/Aceton 1:1) mit einer unsterilen Einmalpipette appliziert und 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde dekantiert und die Zellkulturflasche auf gleiche Weise wie oben mit Leitungswasser zweimal gewaschen, danach einmal mit Aqua dest. ebenfalls unter dem laufenden Wasserhahn. Zum Trocknen wurden die Flaschen nach gründlichem Schütteln mit der Öffnung nach unten unter einen Laborabzug gestellt und bei Raumtemperatur 24 Stunden stehen gelassen.
Die einzige Abweichung bei der Zelllinie HNSCCUM-02T war der erste Waschgang, der mithilfe einer Multipette erfolgte. Dabei wurde auf die den Kolonien gegenüberliegende Seite der Zellkulturplatte Aqua dest. gegeben, die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt und das Wasser verworfen. Der restliche Ablauf erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.3.9 Färben der Zellen

Zum Färben der Tumorzelllinien wurde eine 10%ige Giemsa-Lösung mit Aqua dest. hergestellt, die durch einen Papierfilter filtriert wurde. Für die Fibroblasten, die die Farbe nicht in gleichem Maße annahmen, wurde mit gleicher Methode eine 12%ige hergestellt. Davon wurden ca. 2,5-3 ml in die Zellkulturflasche gegeben und 10 Minuten dort belassen. Daraufhin wurde die Lösung dekantiert, wie oben beschrieben zweimal mit Leitungswasser und einmal mit Aqua dest. gewaschen und ebenfalls wie oben zum Trocknen unter den Abzug gestellt. Dieser Vorgang wurde für beide Zelllinien und die Fibroblasten so durchgeführt.

3.2.3.10 Zählen der Kolonien und Auswertung

Vor dem Zählen wurden die Oberflächen der Zellkulturflaschen mit Desinfektionsmittel und Papiertüchern gereinigt, um bessere Sichtverhältnisse zu schaffen. Es wurde über einem Lichttisch (Transilluminator) gezählt und mit einem Lichtmikroskop kontrolliert, dass nur Kolonien mit ≥ 50 Zellen gezählt wurden. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle notiert, in welcher der Mittelwert aus den zwei Proben pro Behandlung ermittelt wurde und – unter Miteinbezug der Anzahl der ausgesäten Zellen – auch die Überlebensfraktion:

$$\text{Überlebensfraktion} = \frac{MW\ der\ 2\ Proben\ pro\ Behandlung * Anzahl\ ausgesäte\ Zellen\ der\ unbehandelten\ Proben}{MW\ der\ 2\ unbehandelten\ Proben * Anzahl\ ausgesäte\ Zellen\ dieser\ Behandlung}$$

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme IBM SPSS Statistics 25, Graphpad Prism und CompuSyn. In Ersteres wurden die Rohdaten in Form der ausgezählten Kolonien zusammen mit den ausgesäten Zellen eingegeben, in die zwei Letzteren die berechnete Überlebensfraktion.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Zinkoxid-Nanopartikel

Nach der solvothermalen Synthese der ZnO NP wurden diese unter anderem durch Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) charakterisiert. Dabei konnte eine Größe von 14,05 nm ± 0,69 nm anhand von drei Messungen bestimmt werden und die Form wurde als sphärisch charakterisiert (siehe Abbildung 7).

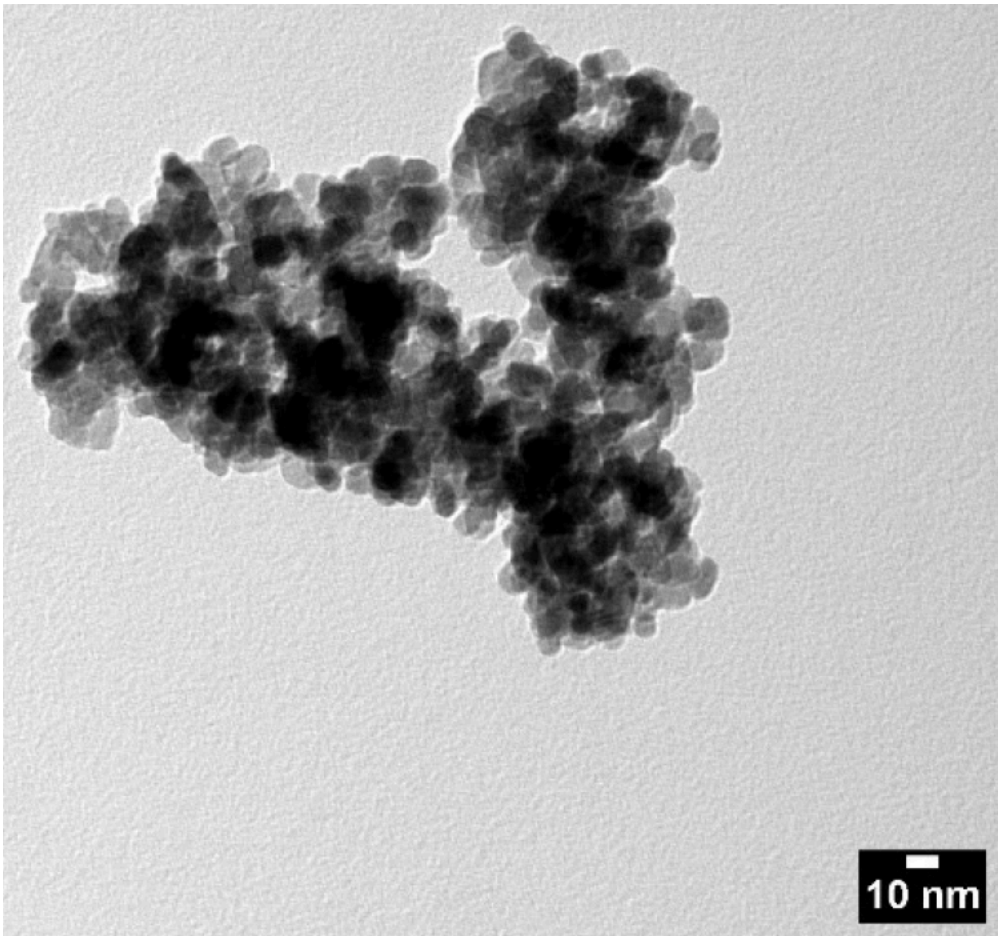


Abbildung 7: Charakterisierung der ZnO NP

Hier ist eine TEM-Aufnahme der verwendeten ZnO NP zu sehen.

Quelle: Melanie Viel, AG Tremel (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Das Zeta-Potential wurde ebenfalls aus drei Messungen bestimmt, es lag bei 26,6 mV.

4.2 Die Überlebensfraktion der einzelnen Zelltypen in Abhängigkeit von ZnO-NP-Konzentration und Bestrahlung

Allgemein war festzustellen, dass die Überlebensfraktionen mit zunehmender Bestrahlungsdosis und steigenden ZnO-NP-Konzentrationen stetig in allen untersuchten Zelltypen abnahm (Tabelle 8, Abbildungen 8-15). Die genauen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln erst nach den Zelltypen (A549, HNSCCUM-02T und Fibroblasten) sortiert vorgestellt und dann bei ZnO-NP-Konzentrationen von 0 µg/ml und 50 µg/ml miteinander verglichen. In nachfolgender Tabelle 8 sind alle SFs (Überlebensfraktionen, *surviving fractions,* Mittelwerte ± Standardabweichungen) von allen getesteten Zelltypen bei allen getesteten Behandlungskombinationen aus ZnO NP und Bestrahlungsdosis dargestellt.

Tabelle 8: Überlebensfraktion aller Zelltypen bei allen getesteten Behandlungen
Die Tabelle zeigt die Mittelwerte aus allen SFs (Überlebensfraktionen, surviving fractions) aller getesteten Zelltypen bei allen Behandlungskombinationen mit Standardabweichung in Klammern. Alle Werte wurden auf drei Nachkommastellen gerundet, eine Tabelle mit allen einzelnen SFs befindet sich im Anhang (Tabelle 10). Bei den Fibroblasten, die ähnlich empfindlich auf diese Behandlungen reagierten wie HNSCCUM-02T-Zellen, wurde kein Versuch mit 100 µg/ml ZnO NP durchgeführt und auch die Bestrahlungsdosis von 8 Gy wurde nur ohne NP getestet. Die Tabelle wird für eine bessere Lesbarkeit auf der nächsten Seite gezeigt.

Zelltyp		0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
A549[1)]	0 µg/ml	1,000 (± 0,000)	0,429 (± 0,039)	0,120 (± 0,047)	0,004 (± 0,000)
	20 µg/ml	0,932 (± 0,148)	0,467 (± 0,256)	0,163 (± 0,114)	0,003 (± 0,002)
	50 µg/ml	0,617 (± 0,142)	0,201 (± 0,111)	0,031 (± 0,017)	0,001 (± 0,001)
	80 µg/ml	0,280 (± 0,108)	0,070 (± 0,066)	0,014 (± 0,013)	0,000 (± 0,000)
	100 µg/ml	0,280 (± 0,117)	0,072 (± 0,052)	0,011 (± 0,008)	0,000 (± 0,000)
HNSCCUM-02T[1)]	0 µg/ml	1,000 (± 0,000)	0,635 (± 0,248)	0,324 (± 0,048)	0,025 (± 0,013)
	20 µg/ml	0,803 (± 0,042)	0,484 (± 0,043)	0,256 (± 0,057)	0,026 (± 0,012)
	50 µg/ml	0,081 (± 0,135)	0,042 (± 0,073)	0,016 (± 0,027)	0,001 (± 0,002)
	80 µg/ml	0,002 (± 0,002)	0,000 (± 0,000)	0,000 (± 0,000)	0,000 (± 0,000)
	100 µg/ml	0,001 (± 0,001)	0,000 (± 0,000)	0,000 (± 0,000)	0,000 (± 0,000)
Fibroblasten[2)]	0 µg/ml	1,000 (± 0,000)	0,267 (± 0,120)	0,065 (± 0,033)	0,001 (± 0,001)
	20 µg/ml	0,794 (± 0,040)	0,276 (± 0,105)	0,075 (± 0,052)	-
	50 µg/ml	0,482 (± 0,142)	0,106 (± 0,017)	0,018 (± 0,010)	-
	80 µg/ml	0,034 (± 0,023)	0,004 (± 0,003)	0,000 (± 0,000)	-
	100 µg/ml	-	-	-	-

[1)] N = 4; [2)] N = 3

4.2.1 Überleben der A549-Zellen nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung

In Abbildung 8 sind die Überlebensfraktionen (*surviving fraction*, SF) der Tumorzelllinie A549 zu sehen, die in Abhängigkeit von ZnO NP-Konzentration und Bestrahlungsdosis abnahmen. Die Kurvenverläufe zeigen, dass sich die Konzentration der NP signifikant auf die SF auswirkte, aber auch, dass kleine Konzentrationsänderungen an den beiden Extremen des getesteten Spektrums (zwischen 0 und 20 µg/ml und zwischen 80 und 100 µg/ml) keinen messbaren Effekt auf die SF hatten. Zum Beispiel nahmen bei keiner Bestrahlung (0 Gy) die SFs für die verschiedenen ZnO-NP-Konzentrationen folgende Werte an (Mittelwerte ± SD aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, N = 4):

- 0 µg/ml = 1 ± 0 (unbehandelte Kontrollgruppe);
- 20 µg/ml = 0,93 ± 0,15;
- 50 µg/ml: 0,62 ± 0,14;
- 80 µg/ml: 0,28 ± 0,11;
- 100 µg/ml: 0,28 ± 0,12.

Man betrachte hier die fast identischen Ergebnisse bei 80 und 100 µg/ml. Die SFs unterschieden sich ab einer Konzentration von 50 µg/ml signifikant ($p < 0,0001$) von der gänzlich unbehandelten Kontrollgruppe (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test). Ein anderes Bild bot sich bei den bestrahlten Gruppen nach Durchführung der gleichen Tests: Während sich bei einer Strahlungsdosis von 2 Gy ebenfalls alle SFs ab einer Konzentration von 50 µg/ml signifikant (dort $0,05 > p > 0,01$; bei höheren Konzentrationen $p < 0,0001$) von der unbehandelten aber mit gleicher Dosis bestrahlten Kontrollgruppe unterschieden, gab es bei höheren Strahlungsdosen keinerlei signifikante Unterschiede der SFs der mit Nanopartikeln behandelten Gruppen zu den jeweiligen Kontrollgruppen.

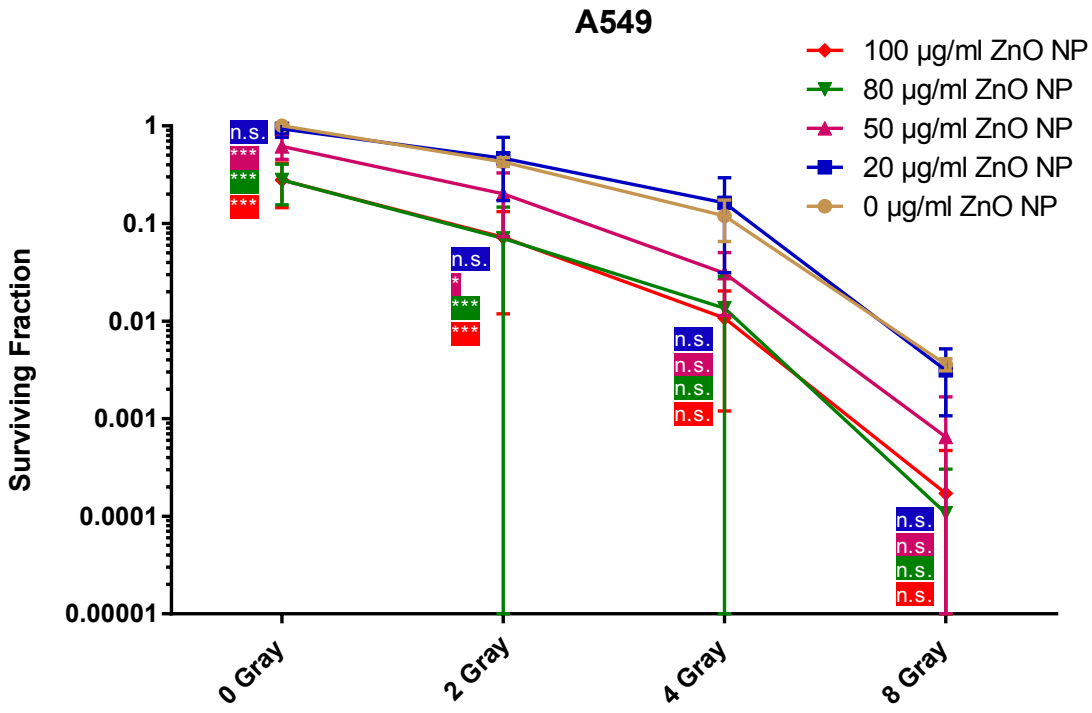


Abbildung 8: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie A549 bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) aus vier voneinander unabhängigen Experimenten (N=4). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die Überlebensfraktion (Surviving Fraction, SF) logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren signifikant verschiedene SFs der verschiedenen NP-Konzentrationen im Vergleich zur nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrollgruppe bei gleicher Bestrahlungsdosis (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; * 0,05 > p > 0,01; *** p < 0,0001). Nicht-signifikante Unterschiede sind mit n.s. markiert.*

In Abbildung 9 sind die SFs der Tumorzelllinie A549 nur für die ZnO-NP-Konzentrationen von 0 und 100 µg/ml und für alle getesteten Bestrahlungsdosen zu sehen. Wie bereits oben erwähnt, unterschieden sich die SFs zwischen diesen beiden NP-Konzentrationen bei gleicher Bestrahlung nur innerhalb der Bestrahlungsdosen von 0 und 2 Gy statistisch signifikant von der Kontrollgruppe (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; jeweils $p < 0{,}0001$), aber nicht mehr bei höheren Bestrahlungsdosen.

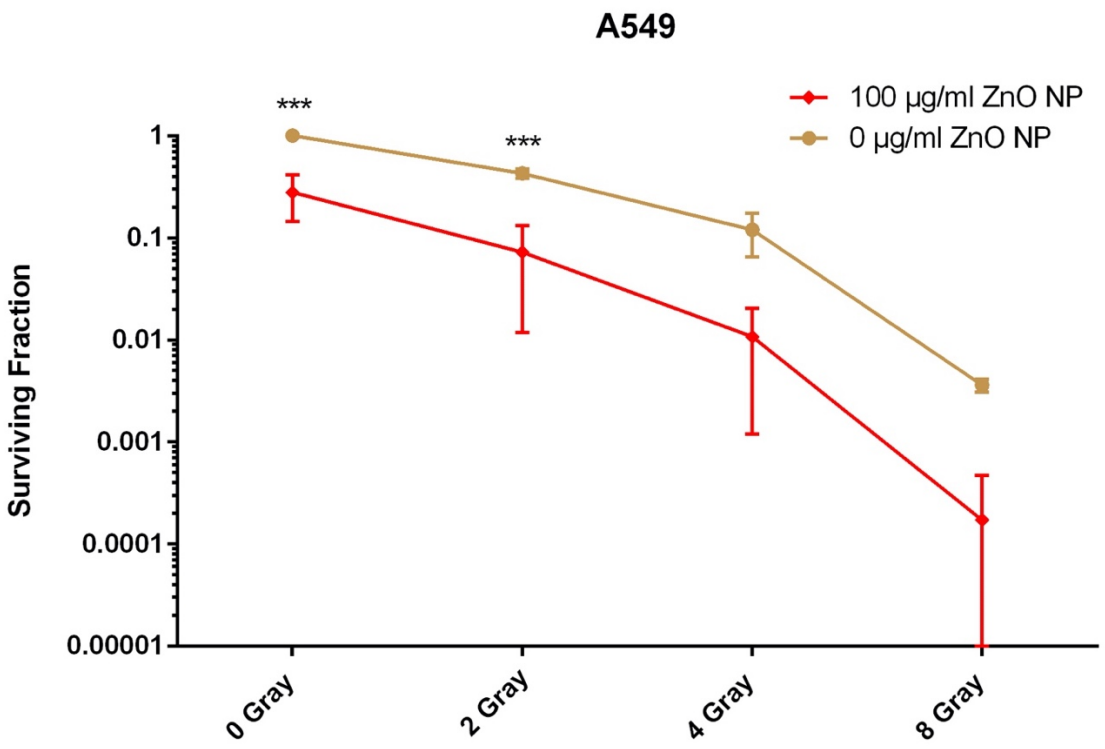


Abbildung 9: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie A549 bei Behandlung mit 0 und 100 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus vier voneinander unabhängigen Experimenten (N=4). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren voneinander signifikant verschiedene SFs bei konstanter Bestrahlungsdosis und verschiedenen NP-Konzentrationen (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; *** $p < 0{,}0001$).*

4.2.2 Überleben der HNSCCUM-02T-Zellen nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung

In Abbildung 10 sind die SFs der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T zu sehen, die auch hier in Abhängigkeit von der ZnO NP-Konzentration und der Bestrahlungsdosis abnahmen. Die Kurvenverläufe zeigen, dass sich die Konzentration der NP signifikant auf die SFs auswirkte, aber auch, dass kleine Konzentrationsänderungen an den beiden Extremen des getesteten Spektrums (zwischen 0 und 20 µg/ml und zwischen 80 und 100 µg/ml) keinen bedeutenden Effekt auf die SF hatten. Man sieht hier deutlich den Effekt der ZnO NP, die hier

eine größere Auswirkung auf die SF hatten als die Bestrahlung, wie man an den flach abfallenden Kurven der einzelnen Konzentrationen sehen kann. Zum Beispiel war bei der zweithöchsten getesteten Bestrahlungsdosis (4 Gy) die SF für die verschiedenen ZnO-NP-Konzentrationen folgendermaßen (Mittelwerte ± SD aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, N = 4):

- 0 µg/ml = 0,32 ± 0,05;
- 20 µg/ml = 0,26 ± 0,06;
- 50 µg/ml: 0,02 ± 0,03;
- 80 µg/ml: 0,00015 ± $8{,}17 \times 10^{-5}$;
- 100 µg/ml: $8{,}44 \times 10^{-5} \pm 6{,}52 \times 10^{-5}$.

Die Werte der SFs bei den unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationen unterschieden sich nur bei 20 µg/ml nicht signifikant, bei allen anderen jedoch signifikant von der Kontrollgruppe (hier 4 Gy und 0 µg/ml ZnO NP) (zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; $p < 0{,}0001$).

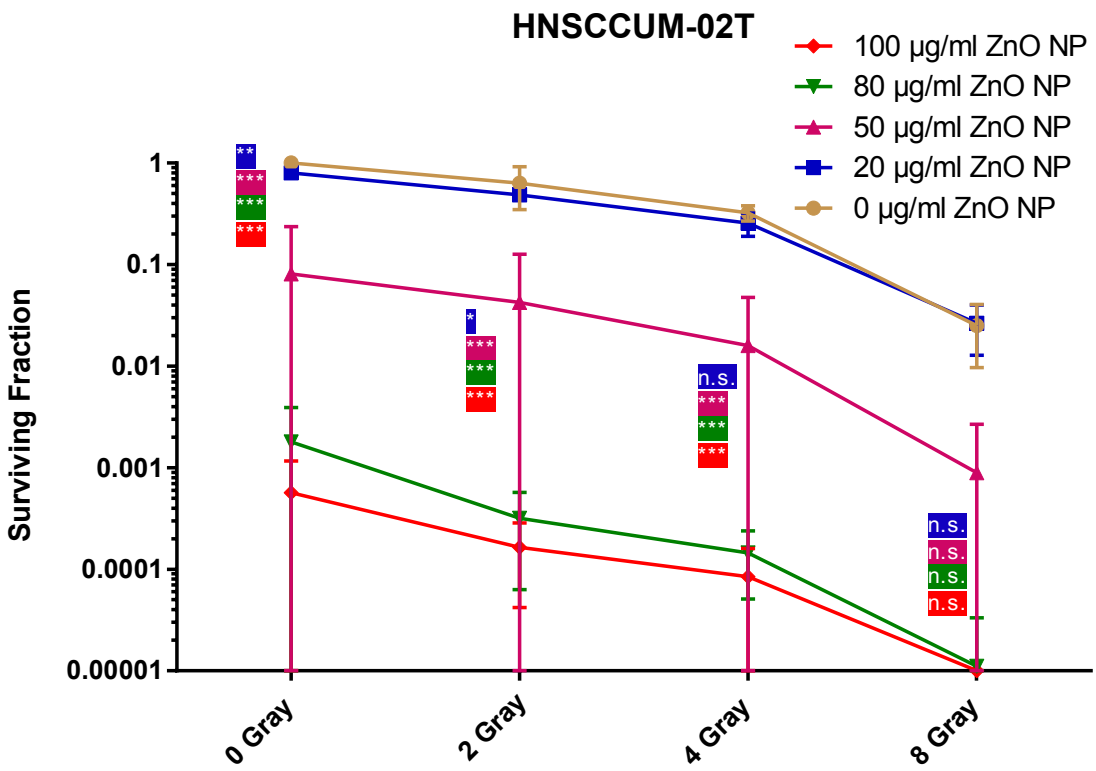


Abbildung 10: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus vier voneinander unabhängigen Experimenten (N=4). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren signifikant verschiedene SFs der verschiedenen NP-Konzentrationen im Vergleich zur nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrollgruppe bei gleicher Bestrahlungsdosis (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,0001). Nicht-signifikante Unterschiede sind mit n.s. markiert.*

In Abbildung 11 sind die SFs der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T nur für die ZnO-NP-Konzentrationen von 0 und 100 µg/ml und für alle getesteten Bestrahlungsdosen zu sehen. Man erkennt hier deutlich den Effekt der ZnO NP-Konzentration, da sich die Überlebensfraktionen schon bei 0 Gy deutlich unterschieden zwischen Zellen, die ZnO NP erhalten und solchen die keine erhalten haben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei den beiden ZnO NP-Konzentrationen sind mit Sternen gekennzeichnet (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; *** p < 0,0001).

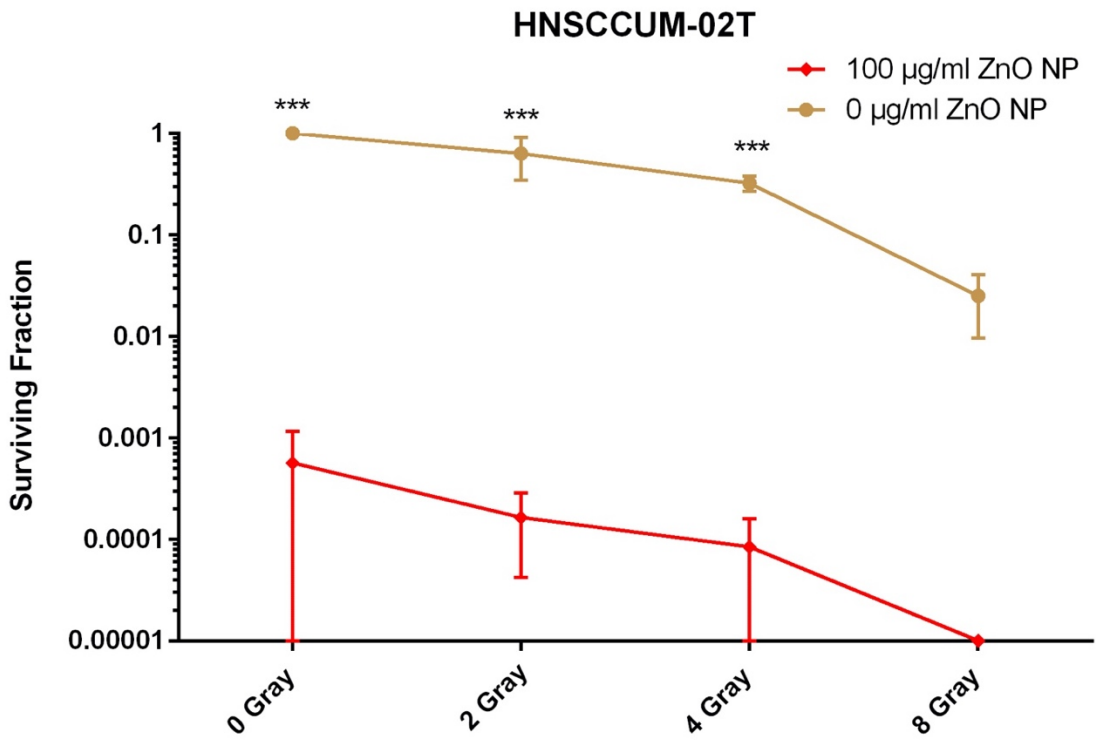


Abbildung 11: Überlebensfraktionen der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T bei 0 und 100 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus vier voneinander unabhängigen Experimenten (N=4). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren voneinander signifikant verschiedene SFs bei konstanter Bestrahlungsdosis aber verschiedenen NP-Konzentrationen (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; *** $p < 0{,}0001$).*

4.2.3 Überleben der Fibroblasten nach kombinierter Bestrahlung und ZnO NP Behandlung

In Abbildung 12 sind die SFs der primären Fibroblasten zu sehen, die auch hier in Abhängigkeit von ZnO NP-Konzentration und Bestrahlungsdosis abnahmen. Man sieht auch hier an den Kurvenverläufen, dass sich die Konzentration der NP auf die SF auswirkte, aber auch, dass bei kleinen Konzentrationsänderungen wie zwischen 0 und 20 µg/ml kaum ein Unterschied in der SF zu erkennen war. Da die Fibroblasten in Vorexperimenten sehr empfindlich auf die hohen NP-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen reagierten, wurde die

NP-Konzentration von 100 µg/ml hier weggelassen und zudem die höchste Bestrahlungsdosis, 8 Gy, nur bei den Proben ohne ZnO NP getestet. Zum Beispiel waren die SFs für die verschiedenen ZnO-NP-Konzentrationen ohne zusätzliche Bestrahlung folgendermaßen (Mittelwerte ± SD aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, N = 3):

- 0 µg/ml = 1 ± 0,00;
- 20 µg/ml = 0,79 ± 0,04;
- 50 µg/ml: 0,48 ± 0,14;
- 80 µg/ml: 0,03 ± 0,02.

Die Werte der SFs bei den unterschiedlichen Konzentrationen unterschieden sich von denen der Kontrollgruppe (hier 0 Gy und 0 µg/ml ZnO NP) bei den Konzentrationen 50 und 80 µg/ml signifikant mit $p < 0,0001$ und bei 20 µg/ml signifikant mit $p < 0,1$ (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test). Bei den anderen Bestrahlungsdosen unterschied sich die SF bei gleicher statistischer Auswertung nur bei 2 Gy und einer NP-Konzentration von 80 µg/ml signifikant ($p < 0,01$) zur Vergleichsgruppe bei gleicher Bestrahlungsdosis, die nicht mit ZnO NP behandelt wurde (siehe Abbildung 13). Bei allen anderen getesteten Bestrahlungsdosen und NP-Konzentrationen waren die Unterschiede zur nicht mit NP-behandelten Kontrollgruppe nicht signifikant.

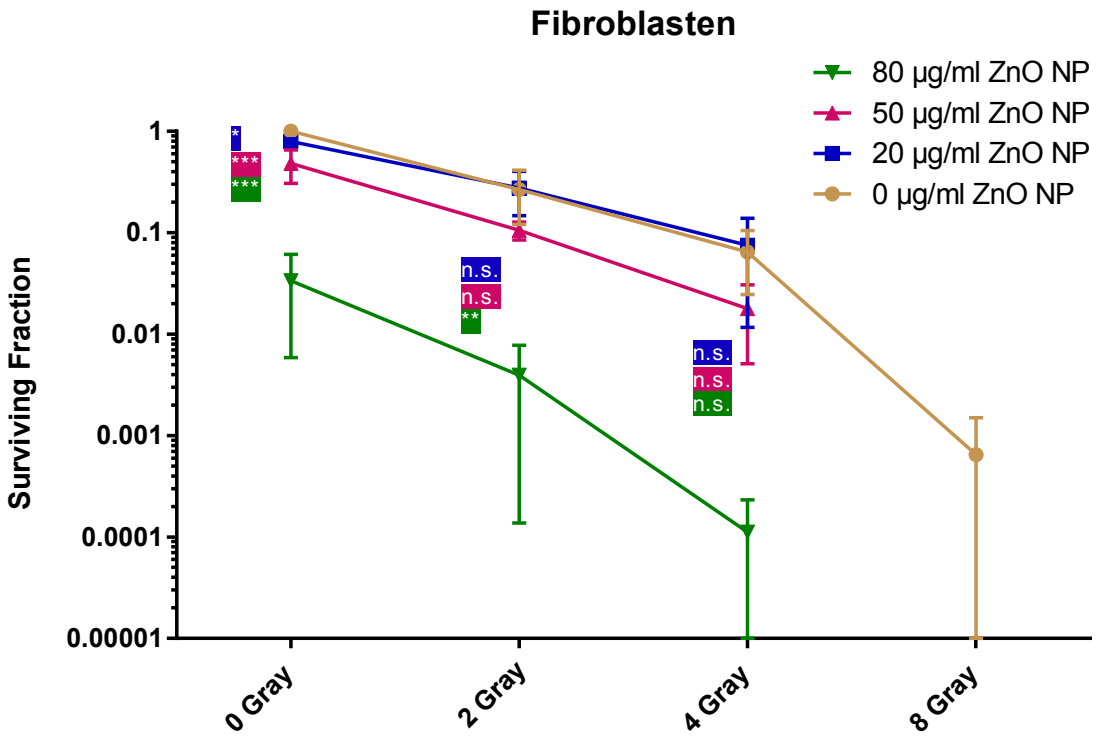


Abbildung 12: Überlebensfraktionen von primären Fibroblasten bei allen getesteten Kombinationen aus ZnO-NP-Behandlung und Bestrahlung

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus drei voneinander unabhängigen Experimenten (N=3). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren signifikant verschiedene SFs der verschiedenen NP-Konzentrationen im Vergleich zur nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrollgruppe bei gleicher Bestrahlungsdosis (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,0001). Nicht-signifikante Unterschiede sind mit n.s. markiert.*

In Abbildung 13 sind die SFs der primären Fibroblasten nur für die ZnO-NP-Konzentrationen von 0 und 80 µg/ml und für alle getesteten Bestrahlungsdosen zu sehen. Wie oben beschrieben, wurden aufgrund der empfindlichen Reaktionen auf die hohen Behandlungskombinationen die Konzentration von 100 µg/ml weggelassen und die Bestrahlungsdosis von 8 Gy nur ohne ZnO NP getestet. Man erkennt auch hier deutlich den Effekt der Höhe der NP-Konzentration schon bei der Konzentration von 80 µg/ml, da sich die Überlebensfraktionen schon bei 0 Gy deutlich unterschieden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den SFs bei den beiden ZnO NP-Konzentrationen sind mit Sternen gekennzeichnet (zweifache

Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; *** p < 0,0001, ** 0,01 > p > 0,001).

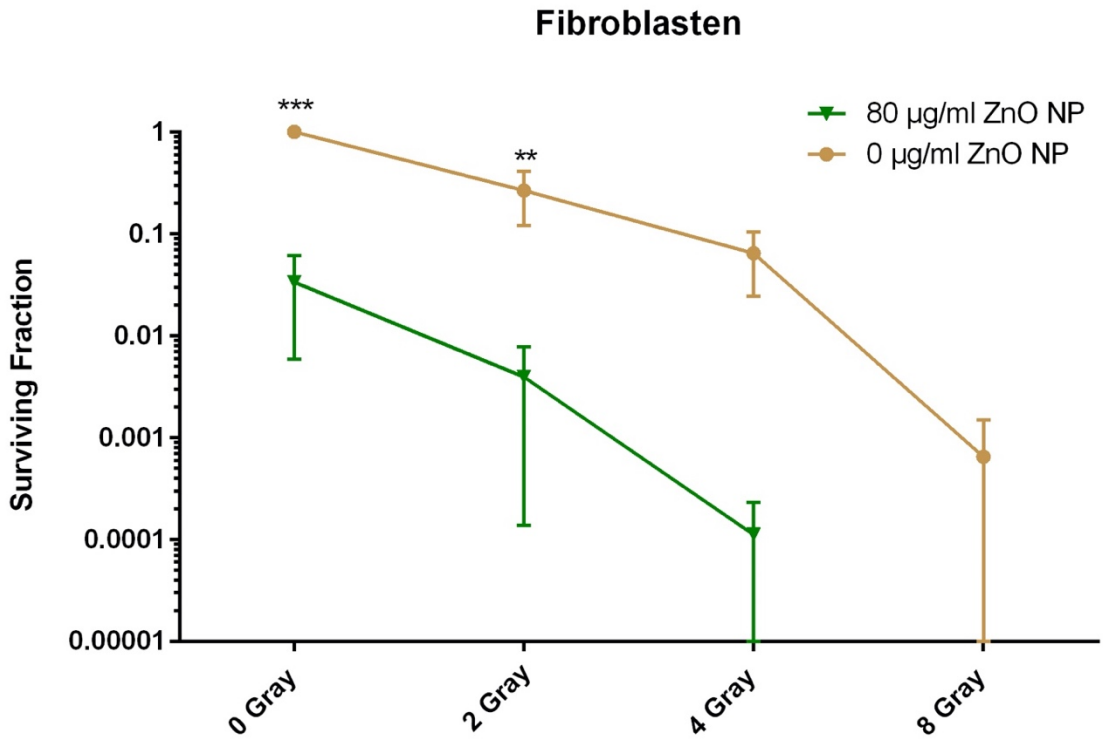


Abbildung 13: Überlebensfraktionen von primären Fibroblasten bei 0 und 80 µg/ml ZnO NP und allen getesteten Bestrahlungsdosen

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus drei voneinander unabhängigen Experimenten (N=3). Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen NP-Konzentrationen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren voneinander signifikant verschiedene SFs bei konstanter Bestrahlungsdosis aber verschiedenen NP-Konzentrationen (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Dunnett's Post-hoc-Test; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,0001).*

4.2.4 Vergleiche zwischen den drei Zelltypen

In Abbildung 14 sind die SFs aller drei getesteten Zelltypen (HNSCCUM-02T, A549 und Fibroblasten) bei allen getesteten Bestrahlungsdosen ohne Zugabe von ZnO NP zu sehen. Man sieht den dosisabhängig abfallenden Kurvenverlauf bei allen Zelltypen, aber auch die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Zelltypen. HNSCCUM-02T schienen am widerstandsfähigsten gegen Bestrahlung zu sein, die Fibroblasten am empfindlichsten und die A549-

Zellen lagen dazwischen. Es wurde eine zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Tukey's Post-hoc-Test durchgeführt. Die SFs der HNSCCUM-02T-Zellen unterschieden sich von denen der Fibroblasten signifikant bei 2 Gy ($p < 0{,}0001$) und 4 Gy ($0{,}01 > p > 0{,}001$) und von denen von A549 signifikant ebenso bei 2 Gy und 4 Gy (jeweils $0{,}05 > p > 0{,}01$). Alle nicht extra aufgeführten Werte unterschieden sich nicht signifikant.

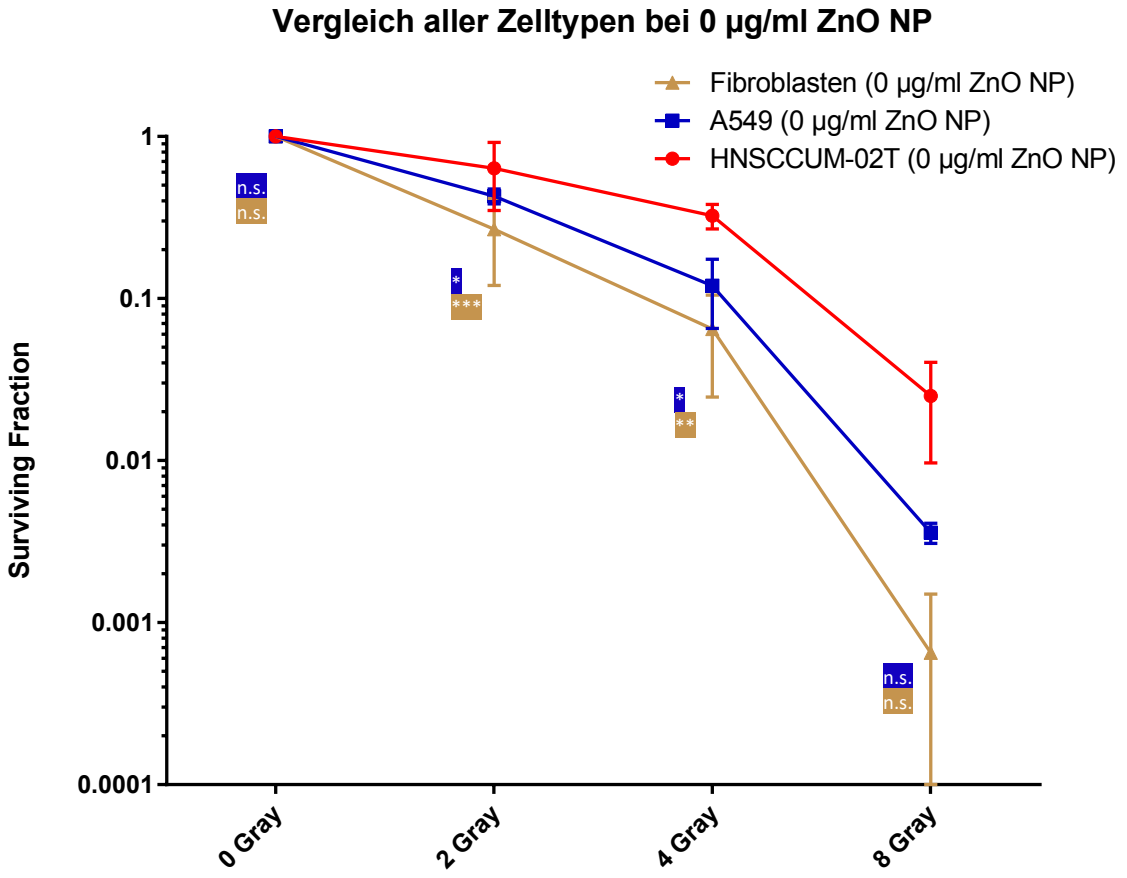


Abbildung 14: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 0 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus bei den Tumorzelllinien vier (N = 4) und bei den Fibroblasten drei (N=3) voneinander unabhängigen Experimenten. Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen Zelltypen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren signifikant verschiedene SFs der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zur Tumorzelllinie HNSCCUM-02T bei gleicher Bestrahlungsdosis (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Tukey's Post-hoc-Test; * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,0001). Nicht-signifikante Unterschiede sind mit n.s. markiert.*

In Abbildung 15 sind die SFs aller drei getesteten Zelltypen (HNSCCUM-02T, A549 und Fibroblasten) bei allen getesteten Bestrahlungsdosen und einer Behandlung mit 50 µg/ml ZnO NP zu sehen. Man sieht hier einen dosis- und konzentrationsabhängigen Kurvenverlauf bei allen Zelltypen. Ebenso kann man die Auswirkung der ZnO NP auf die SF ohne Bestrahlung erkennen. Bei einem Vergleich mit Abbildung 14, die nur die Auswirkung der Bestrahlung ohne NP zeigt, fällt dies deutlich auf, da alle Zelltypen in Abbildung 15 bei noch 0 Gy schon Schäden durch die NP-Behandlung davongetragen haben und in Abbildung 14 nicht. Ebenso kann man im Vergleich deutlich erkennen, dass HNSCCUM-02T viel empfindlicher auf die kombinierte Behandlung mit ZnO NP und Bestrahlung reagierten als auf Bestrahlung alleine. Dort waren HNSCCUM-02T-Zellen die widerstandsfähigsten und bei Behandlung mit NP zeigten sie schon ohne Bestrahlung eine deutliche Reaktion auf die ZnO NP, die stärkste im Vergleich zu den anderen Zelltypen. Auch fällt auf, dass bei der hier gezeigten Kombination aus Bestrahlung und NP die Werte der SF von A549 am höchsten sind, bei der Bestrahlung alleine sind sie lediglich die zweithöchsten nach denen von HNSCCUM-02T, die der Fibroblasten sind dort die niedrigsten. Das deutet darauf hin, dass A549-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelltypen am besten mit der Kombinationsbehandlung zurechtkamen. Hier wurde als statistische Analyse ebenfalls eine zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Tukey's Post-hoc-Test durchgeführt. Demnach unterschieden sich nur die Werte bei 0 Gy von HNSCCUM-02T sowohl im Vergleich mit A549 ($p < 0{,}0001$), als auch mit den Fibroblasten signifikant ($0{,}001 > p > 0{,}0001$), alle anderen Werte unterschieden sich nicht signifikant.

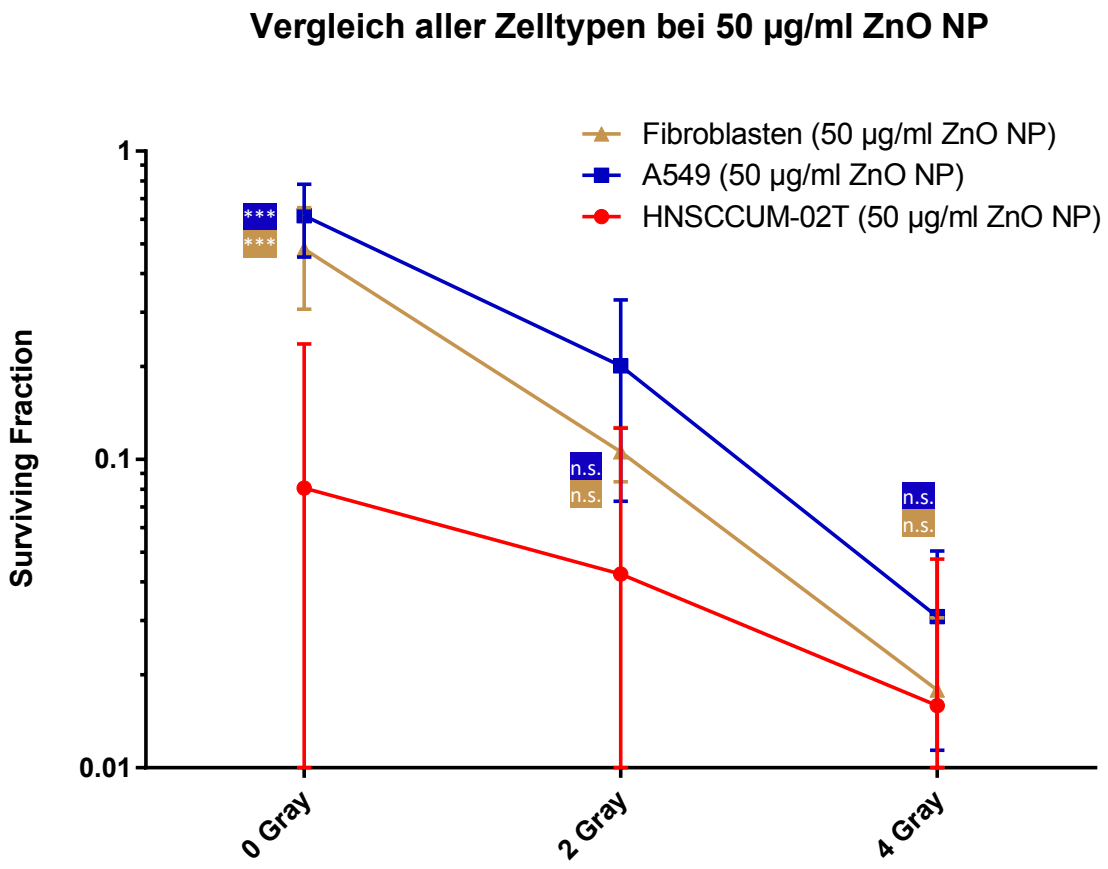


Abbildung 15: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 50 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen

*Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus bei den Tumorzelllinien vier (N = 4) und bei den Fibroblasten drei (N=3) voneinander unabhängigen Experimenten. Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen Zelltypen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Sterne markieren signifikant verschiedene SFs der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zur Tumorzelllinien HNSCCUM-02T bei gleicher Bestrahlungsdosis (zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Tukey's Post-hoc-Test; *** $p < 0{,}0001$). Nicht-signifikante Unterschiede sind mit n.s. markiert (Signifikanzniveau 0,05).*

4.3 Auswirkungen der Bestrahlung in Zellkulturschalen auf die Proliferation der einzelnen Zelltypen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zweier Versuche dargestellt, bei denen untersucht werden sollte, wie sich die drei getesteten Zelltypen bei alleiniger Behandlung mit entweder Bestrahlung – hier ohne Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale, anders als bei den oben beschriebenen CFAs (siehe Kapitel 3.2.3) – oder ZnO NP verhielten. Um diese Ergebnisse mit denen der vorherigen CFAs vergleichen zu können, wurden bei der Aussaat die gleichen Parameter (in Bezug auf Zellzahlen und Zeitintervall zwischen Aussaat und Behandlung) angewendet wie dort (siehe Kapitel 3.2.3.1). Die Morphologie und das Ablöseverhalten der Zellen wurden anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen beurteilt, die 4 h, 24 h und 48 h nach den jeweiligen Behandlungen aufgenommen wurden. Die Behandlungen wurden genauso wie bei den CFAs durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.3.6).

4.3.1 Auswirkung von alleiniger Bestrahlung

Zusammenfassend lässt sich über dieses Experiment sagen, dass alle Zelltypen innerhalb von 48 h durch die alleinige Bestrahlung bei allen Bestrahlungsdosen keine auffälligen morphologischen Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Probe zeigten, was einen deutlichen Unterschied zur alleinigen Behandlung mit ZnO NP darstellt (siehe nächstes Kapitel 4.3.2). Bei manchen Aufnahmen (siehe z.B. Abbildung 16) ist jedoch nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Gruppe ein Unterschied in der Konfluenz zu sehen. Vor allem die Fibroblasten zeigten nahezu keine Veränderung bei den untersuchten Bestrahlungsdosen (siehe Abbildung 18). Zur Veranschaulichung werden in den folgenden Kapiteln zur besseren Übersicht nur einige aussagekräftige und beispielhafte Aufnahmen gezeigt.

4.3.1.1 A549-Zellen nach Bestrahlung

Die nachfolgende Abbildung 16 zeigt den Einfluss von Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen der Tumorzelllinie A549. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Zellzahl ohne Bestrahlung nach 48 h (C) wesentlich höher war als im selben Zeitintervall nach vorausgegangener

Bestrahlung mit 8 Gy (D). 4 h nach Bestrahlung mit derselben Dosis (B) war noch kein nennenswerter Unterschied zu erkennen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bestrahlung (A). Auffällig war, dass die bestrahlten Zellen 48 h nach Bestrahlung (D) wesentlich größer waren im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen.

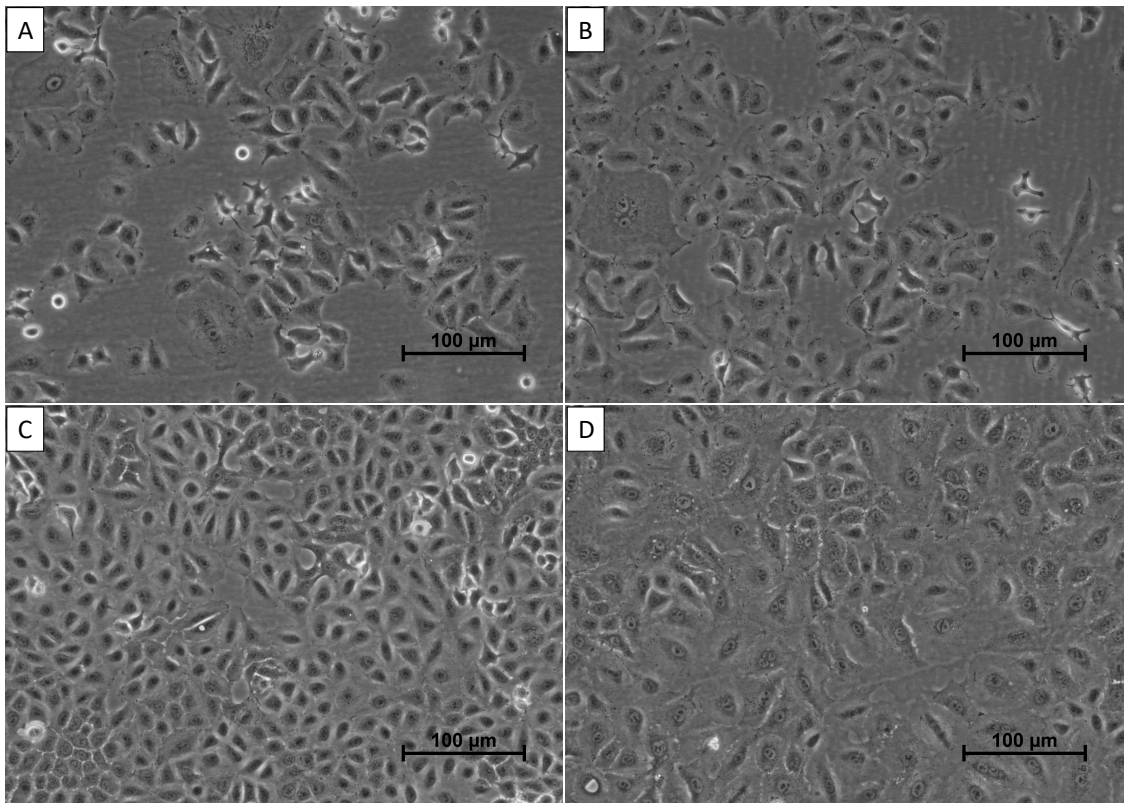


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 nach Bestrahlung

Zellen der Zelllinie A549 mikroskopiert und fotografiert nach (A) 4 h ohne Bestrahlung, (B) 4 h nach Bestrahlung mit 8 Gy, (C) 48 h ohne Bestrahlung und (D) 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy.

4.3.1.2 HNSCCUM-02T-Zellen nach Bestrahlung

Auf Abbildung 17 ist der Einfluss der Bestrahlung auf Zellen der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T zu sehen, nach den gleichen zeitlichen Intervallen und bei gleicher Bestrahlungsdosis wie für A549 (s.o., Kap. 4.3.1.1.). 4 h nach Behandlung war in der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung eine noch geringe Konfluenz der Zellen zu sehen, mit vereinzelten abgelösten toten Zellen (A), ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Gruppe nach Bestrahlung mit 8 Gy (B). Nach 48 h war sowohl bei der Kontrollgruppe (C) als auch bei derjenigen mit einer

Bestrahlungsdosis von 8 Gy (D) eine wesentlich höhere Anzahl an abgelösten Zellen zu sehen und zudem eine sehr hohe Konfluenz.

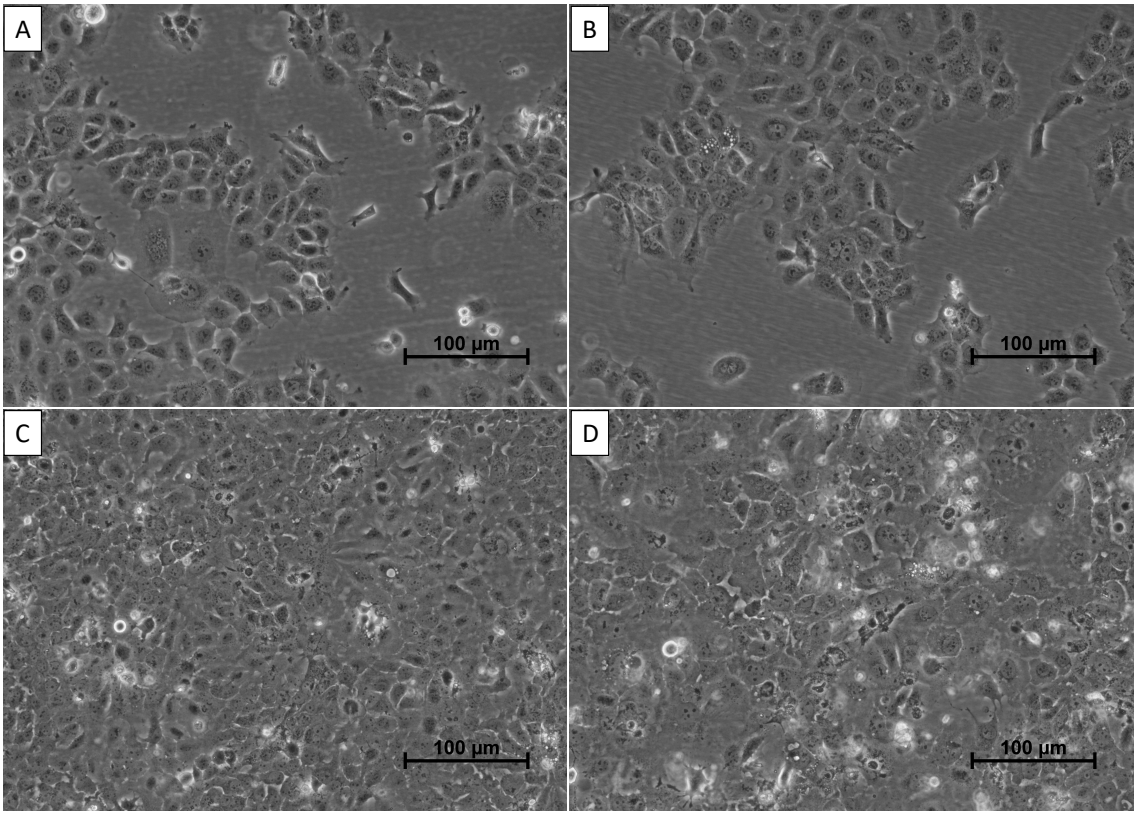


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HNSCCUM-02T nach Bestrahlung

Zellen der Zelllinie HNSCCUM-02T mikroskopiert und fotografiert nach (A) 4 h ohne Bestrahlung, (B) 4 h nach Bestrahlung mit 8 Gy, (C) 48 h ohne Bestrahlung und (D) 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy.

4.3.1.3 Fibroblasten nach Bestrahlung

Abbildung 18 stellt die Auswirkungen der Bestrahlung auf Fibroblasten dar, die ebenfalls nach den gleichen Zeitintervallen wie A549 und HNSCCUM-02T (s.o., Kap. 4.3.1.1 und 4.3.1.2) aufgenommen wurden. Diese Zellen hatten anscheinend die geringsten morphologischen Veränderungen durch die Bestrahlung davongetragen, man erkennt 4 h nach Behandlung bei der Kontrollgruppe (A) noch keine vollständige Konfluenz und sehr wenige abgelöste Zellen und ein fast identisches Bild zeigte sich nach der Bestrahlung mit 8 Gy ebenfalls (B). Nach 48 h kann man zwischen der Kontrollgruppe (C) und der mit

8 Gy bestrahlten Gruppe (D) keine wesentlichen Unterschiede feststellen, sie wiesen beide eine ähnliche Konfluenz und eine ähnliche Anzahl an abgelösten Zellen auf.

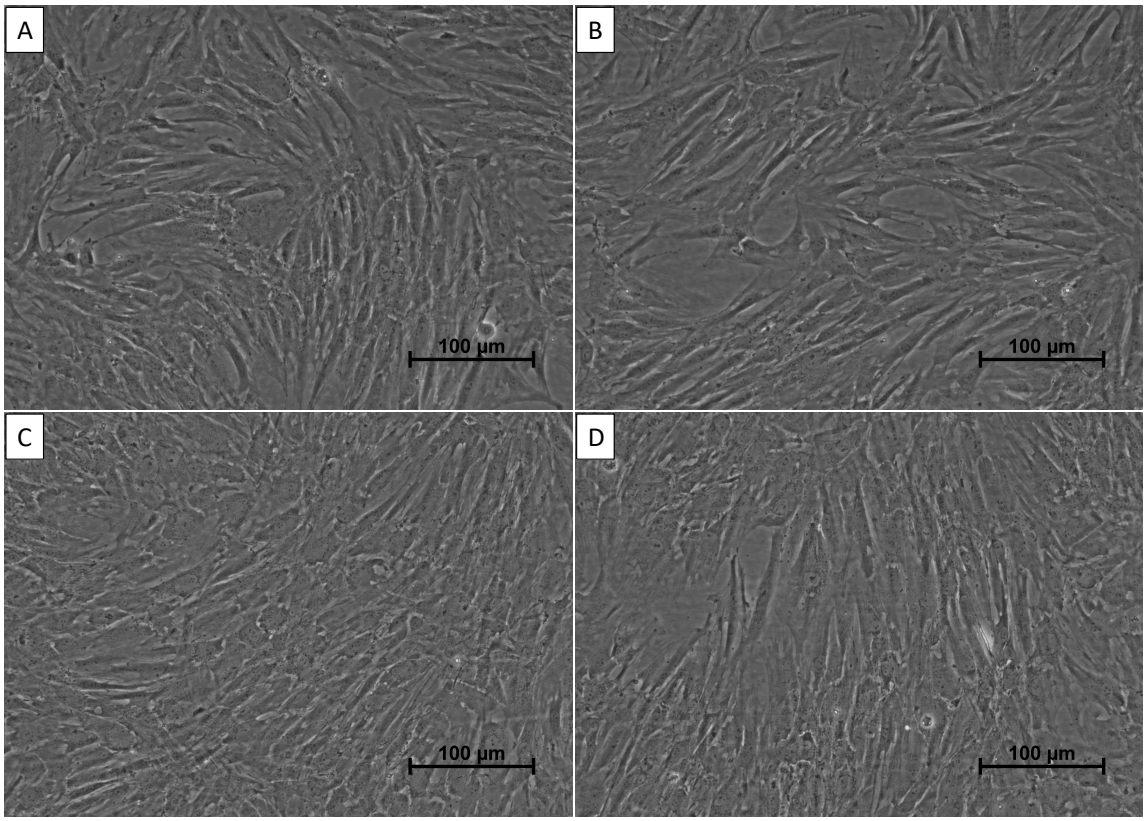


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Bestrahlung

Fibroblasten mikroskopiert und fotografiert nach (A) 4 h ohne Bestrahlung, (B) 4 h nach Bestrahlung mit 8 Gy, (C) 48 h ohne Bestrahlung und (D) 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy.

4.3.2 Auswirkungen der alleinigen Behandlung mit ZnO NP

Bei der alleinigen Behandlung mit ZnO NP wurde genauso vorgegangen wie bei den oben beschriebenen CFAs (siehe Kapitel 3.2.2.2). Nach der 4-stündigen Inkubationszeit wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und so das Nährmedium mit NP gegen eines ohne NP ausgetauscht. Für den Rest der Versuchszeit wurde kein Mediumswechsel mehr durchgeführt. Nach Durchführung des Experiments waren deutliche morphologische Unterschiede zwischen den Zelltypen und den Behandlungsdosen zu erkennen. Die Zellen schienen auf die ZnO NP deutlich empfindlicher zu reagieren als auf alleinige

Bestrahlung (siehe voriges Kapitel 4.3.1). Vor allem bei der Zelllinie HNSCCUM-02T stieg die Anzahl der abgelösten Zellen mit steigender NP-Konzentration. Die Fibroblasten zeigten eine verlangsamte Reaktion auf die NP, deren Wirkung sich erst nach einem Tag beobachten ließ. Bei der Zelllinie A549 konnte man wie bei den HNSCCUM-02T-Zellen ebenfalls nach 4 h die ersten Effekte erkennen, jedoch in geringerem Ausmaß.

4.3.2.1 A549-Zellen nach Behandlung mit ZnO NP

In der folgenden Abbildung 19 kann man anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen die Auswirkung von ZnO NP auf die Proliferation von Zellen der Tumorzelllinie A549 erkennen. Es sind jeweils drei Konzentrationen von ZnO NP (0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (nach 4 h, 24 h und 48 h) abgebildet. Hier kann man den Effekt der NP im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf der linken Seite (Abbildung 19A, D und G) nachvollziehen. Schon nach 4 h war bei einer Konzentration von 50 µg/ml (B) anhand der abgerundeten Zellen deutlich der Einfluss der NP zu sehen, der zu den späteren Zeitpunkten wieder schwächer zu werden schien (E, H), da sie später eine ähnliche Konfluenz aufwiesen wie die unbehandelte Gruppe. Sehr deutlich war der Effekt der höchsten getesteten Konzentration, 100 µg/ml, bei welcher schon nach 4 h die meisten Zellen abgerundet waren (C) und nach 24 h (F) bzw. 48 h (I) fast alle Zellen von der Zellkulturschale abgelöst waren.

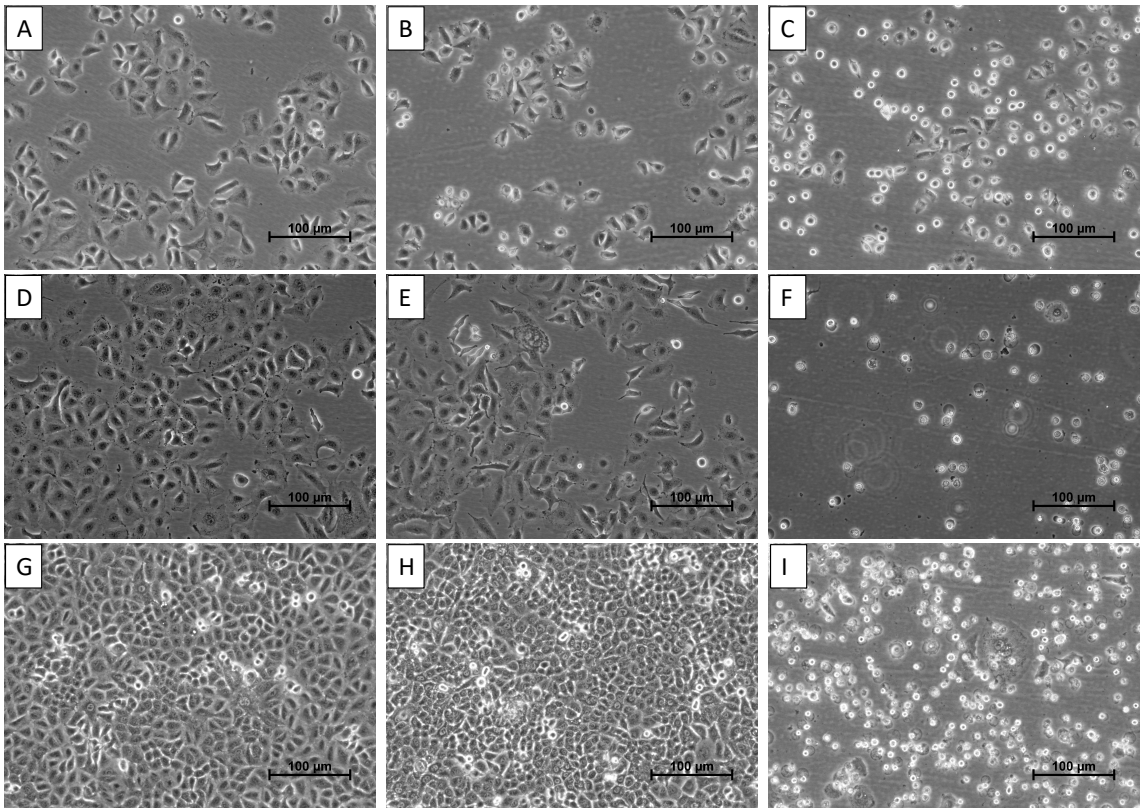


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 nach Behandlung mit ZnO NP

Zellen der Zelllinie A549 mikroskopiert und fotografiert nach

(A) 4 h ohne ZnO NP, (B) 4 h mit 50 µg/ml, (C) 4 h mit 100 µg/ml,
(D) 24 h ohne ZnO NP, (E) 24 h mit 50 µg/ml, (F) 24 h mit 100 µg/ml,
(G) 48 h ohne ZnO NP, (H) 48 h mit 50 µg/ml, (I) 48 h mit 100 µg/ml.

4.3.2.2 HNSCCUM-02T nach Behandlung mit ZnO NP

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen der nachfolgenden Abbildung 20 sieht man den Effekt von ZnO NP auf die Proliferation der Zelllinie HNSCCUM-02T. Die Zellen wurden mit den gleichen NP-Konzentrationen behandelt und nach den gleichen zeitlichen Intervallen aufgenommen wie im vorigen Kapitel (4.3.2.1) und sind in der gleichen Reihenfolge wie dort angeordnet.

Die Kontrollgruppe ohne ZnO-Behandlung zeigt die normale Proliferation (Abbildung 20A, D, G) nach den gleichen Zeitintervallen wie die behandelten Proben weiter rechts in Abbildung 20. Man kann schon nach 4 h bei einer Konzentration von 50 µg/ml deutliche Effekte der ZnO NP erkennen, da hier schon die meisten Zellen von der Zellkulturschale abgelöst waren (B). Dieses Phänomen zeigte sich dementsprechend auch nach 24 h und 48 h (E, H). Auch

bei höheren Konzentrationen (80 µg/ml, nicht abgebildet) wie bei 100 µg/ml zeigte sich ein ähnliches Bild. Schon nach 4 h (C) waren alle Zellen abgelöst, genau wie nach 24 h (F) und 48 h (I). Diese Zelllinie zeigte die deutlichsten Effekte nach der ZnO NP-Behandlung.

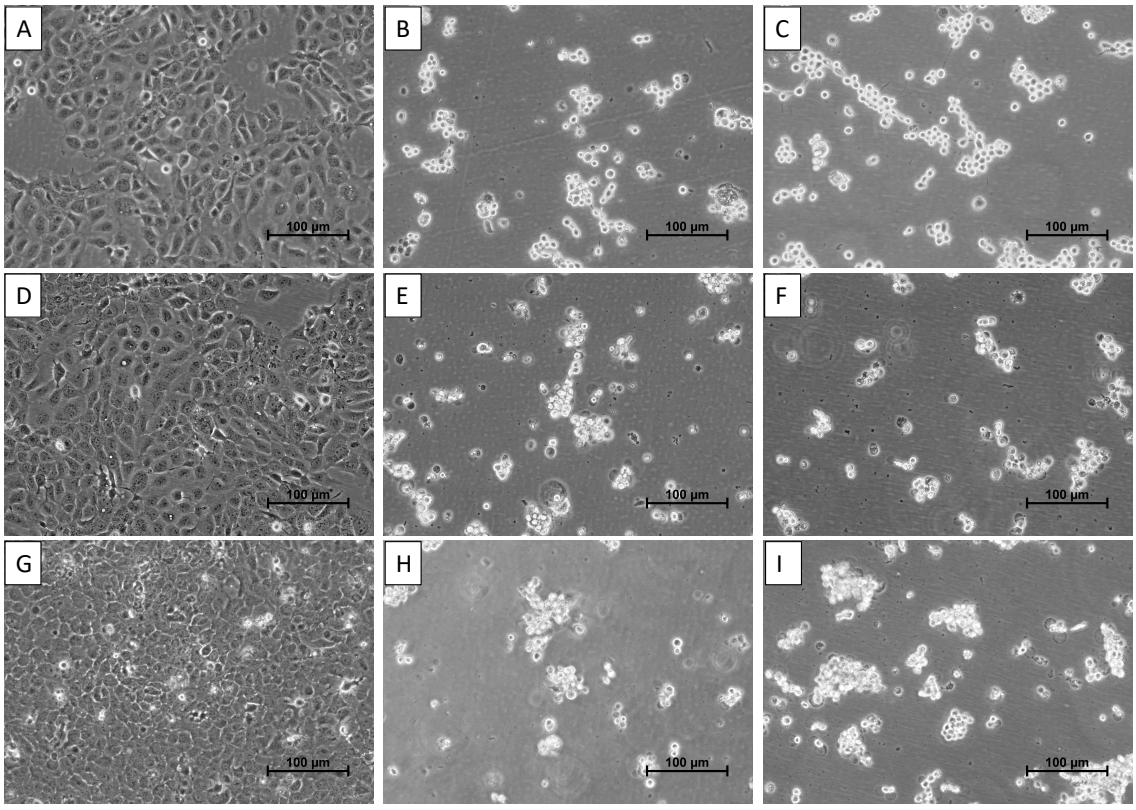


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HNSCCUM-02T nach Behandlung mit ZnO NP

Zellen der Zelllinie HNSCCUM-02T mikroskopiert und fotografiert nach

(A) 4 h ohne ZnO NP, (B) 4 h mit 50 µg/ml, (C) 4 h mit 100 µg/ml,

(D) 24 h ohne ZnO NP, (E) 24 h mit 50 µg/ml, (F) 24 h mit 100 µg/ml,

(G) 48 h ohne ZnO NP, (H) 48 h mit 50 µg/ml, (I) 48 h mit 100 µg/ml.

4.3.2.3 Fibroblasten nach Behandlung mit ZnO NP

Auf Abbildung 21 sieht man anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen die Folgen der Behandlung mit ZnO NP auf die Proliferation von Fibroblasten. Diese wurden nach den gleichen zeitlichen Intervallen und mit den gleichen NP-Konzentrationen aufgenommen wie in den vorigen Kapiteln 4.3.2.1 und 4.3.2.2 und sind in der gleichen Reihenfolge angeordnet.

Die unbehandelte Kontrollgruppe ist wieder in den Abbildung 21A, D und G dargestellt. Im Vergleich zu dieser kann man sehen, dass sich die Fibroblasten bei einer Konzentration von 50 µg/ml (B, E, H) auch sehr ähnlich verhielten wie die Kontrollgruppe und dass sie keine deutlichen morphologischen Veränderungen durch die Behandlung mit ZnO NP davontrugen. Selbst bei einer Konzentration von 100 µg/ml konnte man nach 4 h keine großen Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennen (C). Bei dieser Konzentration waren jedoch nach 24 h (F) ein deutlicher Einbruch der Proliferation und einige von der Zellkulturflasche abgelöste Zellen zu erkennen. Nach 48 h (I) verstärkte sich dieses Bild, so konnte man hier nur noch vereinzelte physiologisch geformte Fibroblasten sehen, die meisten hatten sich abgelöst. Die Fibroblasten zeigten sich demnach ähnlich widerstandsfähig wie die A549-Zellen, soweit das anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen zu beurteilen war.

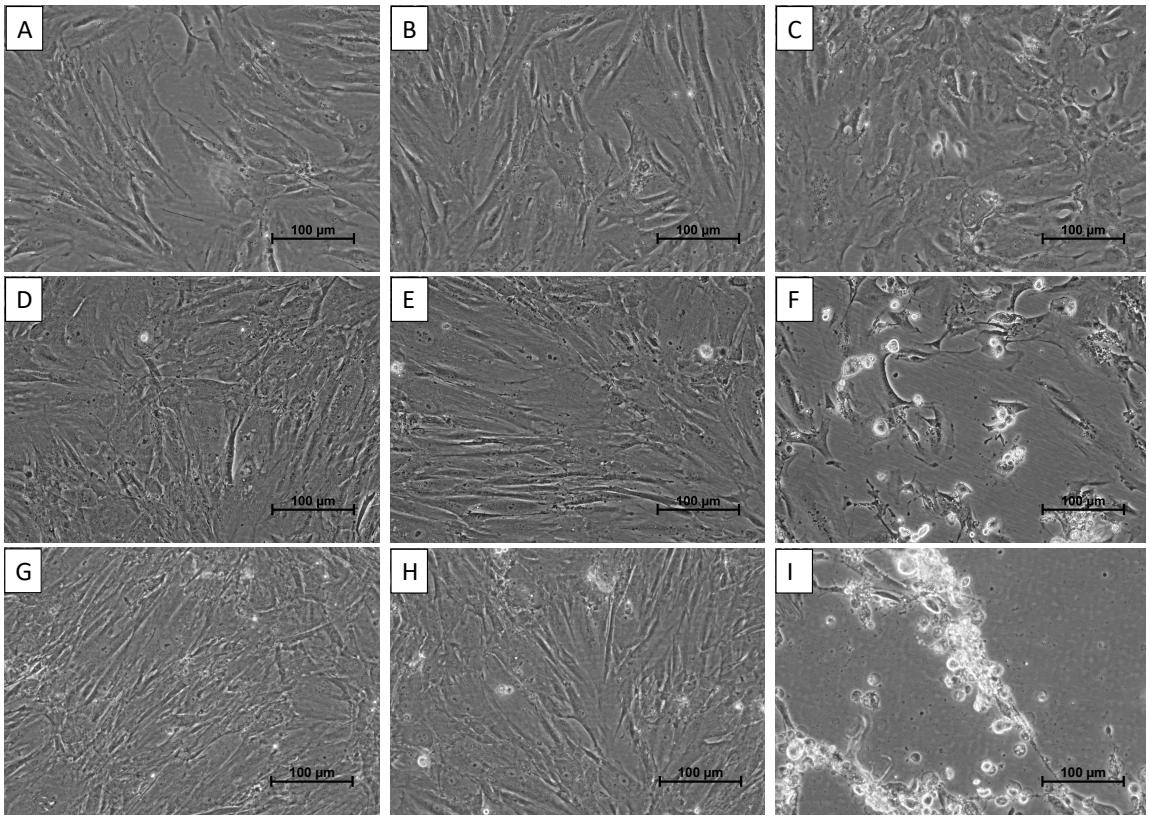


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Behandlung mit ZnO NP

Fibroblasten mikroskopiert und fotografiert nach

(A) 4 h ohne ZnO NP, (B) 4 h mit 50 µg/ml, (C) 4 h mit 100 µg/ml,

(D) 24 h ohne ZnO NP, (E) 24 h mit 50 µg/ml, (F) 24 h mit 100 µg/ml,

(G) 48 h ohne ZnO NP, (H) 48 h mit 50 µg/ml, (I) 48 h mit 100 µg/ml.

4.4 Synergismus, Antagonismus und additiver Effekt von ZnO NP und Bestrahlung

Um herauszufinden, ob ZnO NP und Bestrahlung bei Anwendung an einer Zellpopulation einen synergistischen, additiven oder antagonistischen Effekt haben, wurde das Programm CompuSyn (156) herangezogen (siehe Kapitel 3.1.7). Ein additiver Effekt ist so groß wie die Effekte der zwei einzelnen Komponenten zusammengezählt (in diesem Fall Behandlung mit ZnO NP und Bestrahlung). Bei einem Synergismus hingegen ist der Gesamteffekt größer als die Summe der einzelnen Effekte, die beiden Komponenten verstärken sich gegenseitig. Ein Antagonismus bedeutet dagegen, dass beide Komponenten gegeneinander wirken und den jeweiligen Effekt schwächen, der Gesamteffekt ist also kleiner als im Fall eines additiven Effekts.

Die Daten wurden als Kehrwert der SF für jeden Zelltypen getrennt eingegeben. Für die Berechnung des CI (*combination index*) aus den eingegebenen Werten wurde *non-constant ratio* als Voreinstellung ausgewählt, da die Dosierungen der beiden Behandlungskomponenten im Experiment nicht durchgehend im gleichen Verhältnis zueinanderstanden. Der CI quantifiziert den Synergismusgrad einer Behandlungskombination und gibt somit an, ob und wie stark Synergismus oder Antagonismus sind. Die Autoren der Software teilen das Zusammenspiel zweier Faktoren über den CI in folgende Kategorien ein:

1) *very strong synergism* (< 0,1),
2) *strong synergism* (0,1-0,3),
3) *synergism* (0,3-0,7),
4) *moderate synergism* (0,7-0,85),
5) *slight synergism* (0,85-0,90),
6) *nearly additive* (0,90-1,10),
7) *slight antagonism* (1,10-1,20),
8) *moderate antagonism* (1,20-1,45),
9) *antagonism* (1,45-3,3),
10) *strong antagonism* (3,3-10),
11) *very strong antagonism* (> 10).

In Tabelle 9 werden die CIs für alle getesteten Behandlungskombinationen und Zelltypen zusammengefasst. Hier ist wieder deutlich zu sehen, wie unterschiedlich die Tumorzelllinien auf die Behandlungen reagierten; während

bei HNSCCUM-02T alle Kombinationen einen additiven oder gar antagonistischen Effekt aufwiesen, gibt es bei A549 auch drei Kombinationen (2 Gy + 80 µg/ml, 4 Gy + 50 µg/ml und 4 Gy + 100 µg/ml), die einen synergistischen Effekt zeigten. Auffällig ist auch, dass eine dieser Kombinationen (2 Gy + 80 µg/ml) auch bei den Fibroblasten als einzige einen synergistischen Effekt zeigte. Die übrigen Kombinationen waren bei A549 und den Fibroblasten auch entweder additiv oder antagonistisch.

Tabelle 9: Synergistischer, antagonistischer und additiver Effekt von ZnO NP und Bestrahlung

Auswertung mithilfe der Software CompuSyn. Die Tabelle zeigt den CI (combination index) bei allen getesteten Behandlungskombinationen und Zelltypen. Einteilung der jeweiligen CIs: 4) moderate synergism (0,7-0,85), 5) slight synergism (0,85-0,90), 6) nearly additive (0,90-1,10), 7) slight antagonism (1,10-1,20), 8) moderate antagonism (1,20-1,45), 9) antagonism (1,45-3,3). Farbenlegende: synergistischer, additiver und antagonistischer Effekt

Zelltyp		0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
A549	0 µg/ml	-	-	-	-
	20 µg/ml	-	1,31843[8)]	1,38706[8)]	0,99906[6)]
	50 µg/ml	-	1,12381[7)]	0,86808[5)]	1,06764[6)]
	80 µg/ml	-	0,88890[5)]	0,97913[6)]	1,13622[8)]
	100 µg/ml	-	0,99750[6)]	0,70527[4)]	1,18194[7)]
HNSCCUM-02T	0 µg/ml	-	-	-	-
	20 µg/ml	-	1,44554[8)]	1,61574[9)]	1,21789[8)]
	50 µg/ml	-	1,05658[6)]	1,06796[6)]	1,18559[7)]
	80 µg/ml	-	1,05303[6)]	1,20931[8)]	1,52187[9)]
	100 µg/ml		1,27722[8)]	1,43349[8)]	-
Fibroblasten	0 µg/ml	-	-	-	
	20 µg/ml	-	1,44977[8)]	1,41194[8)]	-
	50 µg/ml	-	1,41365[8)]	1,08554[6)]	-
	80 µg/ml	-	0,80554[4)]	1,05415[6)]	-
	100 µg/ml	-	-	-	-

5 Diskussion

Seitdem das Potential von Zinkoxid-Nanopartikeln (ZnO NP) in der Tumorbehandlung entdeckt worden ist, haben sich bereits viele Forscher mit dem Thema auseinandergesetzt und sind zu einigen vielversprechenden Ergebnissen gekommen. Es wurde gefunden, dass ZnO NP sowohl auf menschliche (116) als auch auf prokaryotische Zellen (86) genotoxisch und zytotoxisch wirken können. Eine weitere, besonders für die Tumorbehandlung wichtige Entdeckung war die Beobachtung, dass die Viabilität oder das längerfristige Überleben von Zellen verschiedenster Tumorzelllinien bei bestimmten Konzentrationen an ZnO NP stark herabgesetzt wird, während die im Vergleich untersuchten gesunden menschlichen Zellen keinen oder nur geringen Schaden davontrugen (72,134–136). Außerdem wurde herausgefunden, dass die Kombination aus Radiotherapie und ZnO NP im Vergleich zu alleiniger Radiotherapie die Überlebensrate von Tumorzellen um das 1,5- bis Zweifache erniedrigen kann (140).

Eine Weiterverfolgung dieser Ergebnisse verspricht sehr große Vorteile für die Tumorbehandlung, wie zum Beispiel eine niedrigere Strahlenbelastung für den Patienten bei gleichbleibendem Therapieerfolg oder sogar die gezielte Entfernung des Tumors ohne Schädigung des benachbarten Gewebes, was zu einer enormen Steigerung der Lebensqualität für die Patienten nach der Behandlung führen würde.

Deswegen knüpft diese Arbeit an die bereits publizierten Ergebnisse aus der AG Brieger (72) an und verfolgt das Thema ZnO NP in Kombination mit Bestrahlung weiter. Aufgrund der starken Heterogenität verschiedener Arten von Tumoren wurden die Versuche mit zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien (HNSCCUM-02T und A549) und im Vergleich dazu mit Zellen aus einem gesunden Gewebe konkret an primären Fibroblasten durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, wie hoch die Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an ZnO NP und der Bestrahlungsdosis ist, wozu ein Koloniebildungstest diente. Er zeigt, wie viele Zellen die entsprechende Behandlung überleben und erneut Kolonien bilden, ergo erneut proliferieren können.

Ausgehend von den genannten vorausgegangenen Forschungsergebnissen aus der AG Brieger wurde erwartet, dass die Überlebensrate mit steigender

NP-Konzentration und Bestrahlungsdosis sinkt, aber auch, dass es eine Behandlungskombination gibt, bei der vor allem die Tumorzellen geschädigt werden, ohne dass beträchtlicher Schaden auf die Fibroblasten ausgeübt wird.

5.1 Eigenschaften der Zinkoxid-Nanopartikel

Die für diese Arbeit verwendeten ZnO NP konnten sich in Bezug auf ihre sphärische Form und ihre Größe von 14,05 nm ± 0,69 nm (siehe Kapitel 3.1.2) ähnlich charakterisieren lassen wie diejenigen, die in früheren Studien der AG Brieger verwendet worden waren und auf welchen die oben genannten Experimente aufgebaut hatten (72). Einzig das Zeta-Potential unterschied sich mit hier 26,6 mV von den -67 mV bei den davor hergestellten. Das könnte bedeuten, dass die für diese Arbeit verwendeten ZnO NP andere Eigenschaften besaßen als vorher verwendete oder ggf. danach verwendete, wenn dort das Zeta-Potential ebenfalls anders sein sollte. Da die neuen ZnO NP aber bei vorausgegangenen Testläufen ähnliche Tendenzen gezeigt hatten wie die früher verwendeten, wurde davon ausgegangen, dass sie trotz des abweichenden Zeta-Potentials für diese Versuche verwendet werden konnten.

5.2 Verhalten der verschiedenen Zelltypen nach Behandlung

Die Ergebnisse zeigten bei allen getesteten Zelltypen eine SF, die in Abhängigkeit von ZnO NP-Konzentration und Bestrahlungsdosis abnahm (Abbildung 8-Abbildung 13).

Dabei bildete das Konzentrationsspektrum zwischen 0 und 100 µg/ml den gesamten effektiven Wirkbereich der NP ab, was an den sehr ähnlichen Ergebnissen bei 80 und 100 µg/ml, also einer deutlichen Sättigung der SF-Kurven erkennbar ist. Ein ähnliches Bild bot sich bei den niedrigeren NP-Konzentrationen: auch zwischen 0 und 20 µg/ml waren kaum nennenswerte Unterschiede zu erkennen. Die größten Unterschiede der Effekte der unterschiedlichen NP-Konzentration waren demzufolge im Bereich zwischen 20 und 80 µg/ml zu erkennen. Da in diesem Konzentrationsbereich nur noch 50 µg/ml getestet wurde, würde es sich in künftigen Versuchen lohnen, hier kleinere Abstufungen zu wählen und miteinander zu vergleichen.

Der Effekt der Strahlungsdosis war zwischen den Zelltypen uneinheitlich: bei einer Betrachtung der SF-Kurven in der nicht-logarithmischen Darstellung ohne jeglichen Einfluss von NP (0 µg/ml; siehe Abbildung 22 im Anhang) fällt der starke Effekt geringer Strahlungsdosen auf A549 und die Fibroblasten auf, während für HNSCCUM-02T ein linearer Zusammenhang zwischen Bestrahlungsdosis und SF bestand. Aufgrund der außerordentlichen Sensibilität von HNSCCUM-02T gegenüber ZnO NP wies dieser Zelltyp bereits ohne Bestrahlung bei 50 µg/ml eine sehr geringe SF auf, und höhere Bestrahlungsdosen hatten keinen großen Effekt mehr auf die weitere Verringerung der SF (siehe Abbildung 15). Im Gegensatz dazu zeigten die anderen beiden Zelltypen bei einer noch relativ hohen SF ohne Bestrahlung besonders starke Reaktionen auf geringe zusätzliche Bestrahlungsdosen.

Vergleicht man diese Beobachtungen aus den CFAs mit den mikroskopischen Aufnahmen (siehe Kapitel 4.3), fallen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. In den Aufnahmen nach Bestrahlung mit 8 Gy (Abbildung 16) verhielt sich die Tumorzelllinie A549 ähnlich wie im CFA (Abbildung 8), es war in beiden Versuchsformen ein deutlicher Einbruch der Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu erkennen. Die Tumorzelllinie HNSCCUM-02T zeigte ebenfalls bei beiden Versuchen ein ähnliches Muster (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 17), nämlich dass in diesem Fall die alleinige Bestrahlung im

Vergleich zu den anderen getesteten Zelltypen nur einen geringen Effekt auf diese Zelllinie hatte. Im CFA zeigte sich somit HNSCCUM-02T als die am wenigsten empfindliche Zelllinie auf die alleinige Bestrahlung (Abbildung 14). Die primären Fibroblasten dagegen verhielten sich auf den mikroskopischen Aufnahmen anders, als es der CFA nahelegte: auf ersteren wiesen sie nach Bestrahlung mit 8 Gy kaum Unterschiede zu der unbehandelten Kontrollgruppe auf, im CFA reagierten sie dagegen auf die Bestrahlung am empfindlichsten unter allen getesteten Zelltypen (Abbildung 14). Dies könnte an einem Unterschied bei der Durchführung beider Experimente liegen. Für den CFA wurden die Zellen vor der Bestrahlung von den Zellkulturschalen abgelöst. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen für die mikroskopischen Aufnahmen auf den Zellkulturschalen belassen und zu keinem Zeitpunkt abgelöst, was im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Ergebnissen aus CFA und mikroskopischen Aufnahmen darauf hindeuten könnte, dass vor allem die Fibroblasten den größten Schaden durch die Kombination aus Bestrahlung und Ablösung von der Zellkulturplatte davontrugen und danach Schwierigkeiten hatten, wieder zu adhärieren und zu proliferieren.

Bei den mikroskopischen Aufnahmen nach der Behandlung nur mit ZnO NP (Kapitel 4.3.2) ließen sich bei den getesteten drei Zelltypen ebenfalls unterschiedliche und ähnliche Reaktionen im Vergleich mit denjenigen im Versuch des CFAs erkennen. Die Tumorzelllinie A549 zeigte sowohl bei den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 19) als auch an ihrer SF (Abbildung 8) einen Effekt bei einer NP-Konzentration von 50 µg/ml, einen umso deutlichen aber bei 100 µg/ml im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Die Tumorzelllinie HNSCCUM-02T hingegen stellte sich als der empfindlichste Zelltyp gegenüber der Behandlung mit ZnO NP heraus, in beiden Versuchsformen waren schon bei 50 µg/ml deutliche Reaktionen zu sehen. Auf den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 20) waren bereits fast alle Zellen abgerundet oder von der Zellkulturschale abgelöst, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet, und im CFA (Abbildung 10) ist bei dieser Konzentration eine deutliche Abnahme der SF zu sehen, die zeigt, dass auch hier die meisten Zellen nicht mehr zur Proliferation und Koloniebildung in der Lage waren. Den größten Unterschied zwischen den Aufnahmen und den CFAs zeigten wieder (siehe oben im Abschnitt zum Bestrahlungsversuch) die primären Fibroblasten. Diese waren den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 21) zufolge der

widerstandsfähigste Zelltyp, da hier erst bei einer NP-Konzentration von 100 µg/ml und erst nach 24 h sichtbare Effekte zu erkennen waren. Beim Vergleich ihrer SF mit denen der anderen Zelltypen im CFA (Abbildung 15) sah man aber deutlich, dass sie konstant eine geringere SF aufwiesen als die Zelllinie A549, aber eine höhere als HNSCCUM-02T. Das könnte wieder mit den Unterschieden bei beiden Versuchsformen zusammenhängen, da für die mikroskopischen Aufnahmen die Zellen nicht von den Zellkulturschalen abgelöst wurden, sondern nach der NP-Behandlung nur das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Für den CFA wurden die Zellen zwar in der Zellkulturschale mit den NP behandelt, für die Bestrahlung aber abgelöst und in Falcons bestrahlt. Die Ergebnisse im Vergleich könnten auch hier darauf hindeuten, dass die Fibroblasten am empfindlichsten auf das Ablösen reagierten.

5.3 Synergismus, Antagonismus und additiver Effekt der Behandlung mit ZnO NP und Bestrahlung auf die verschiedenen Zelltypen

Bezüglich einzelner Faktoren, die für eine erfolgreiche Therapie nötig sind, ist entscheidend, ob sie sich gegenseitig verstärken können und so bei einer Kombination der Behandlungen jeweils geringere Dosen gemeinsam in der Lage sind denselben therapeutischen Effekt zu erzielen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Faktoren Bestrahlungsdosis und ZnO NP-Konzentration auch auf Synergismus, additive Effekte und Antagonismen hin untersucht. Im Einklang mit den Ergebnissen von Generalov et al. (140) ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Kombination von NP-Behandlung und Bestrahlung immer eine stärkere Wirkung auf die SF hatte als die Bestrahlung in gleicher Dosis alleine. Zudem stellte sich heraus, dass sich die beiden Behandlungsfaktoren bei der Tumorzelllinie A549 am häufigsten gegenseitig verstärkten: hier konnte man sogar bei drei verschiedenen Behandlungskombinationen (2 Gy / 80 µg/ml, 4 Gy / 50 µg/ml, 4 Gy / 100 µg/ml) einen synergistischen Effekt beobachten und bei vier weiteren einen additiven (siehe Kapitel 4.4 und Tabelle 9). Die Fibroblasten zeigten bei einer dieser Kombinationen ebenfalls einen synergistischen Effekt (2 Gy / 80 µg/ml) und bei zwei weiteren einen additiven (Tabelle 9). Bei der Tumorzelllinie HNSCCUM-02T hingegen konnte man keine synergistischen Effekte beobachten, sondern lediglich bei drei Kombinationen einen additiven (2 Gy / 50 µg/ml, 2 Gy / 80 µg/ml, 4 Gy / 50 µg/ml). Dem könnte die oben gezeigte Empfindlichkeit auf die NP-Behandlung zugrunde liegen, wo die ZnO NP alleine schon so effektiv die SF senkten, dass die hier ohnehin wirkungsarme Bestrahlung (Abbildung 14) keinen großen zusätzlichen Effekt mehr gehabt haben könnte und daher kein synergistischer Zusammenhang in dieser Kombination gefunden wurde. Wenn man A549 und HNSCCUM-02T vergleicht, zeigte sich auch deutlich die Heterogenität der einzelnen Tumore und ihre unterschiedliche Reaktion auf gleiche Behandlungsmethoden. Dies unterstreicht die sich daraus ergebende Bedeutung der individuellen Anpassung von Therapiemöglichkeiten.

Die Kombination von 2 Gy und 80 µg/ml ZnO NP zeigte sich in allen drei Zelltypen als synergistisch (A549, FB) oder additiv (HNSCCUM-02T), was jedoch als therapeutische Kombination nicht die optimalen Ergebnisse zeigen dürfte, da

sie die Fibroblasten als gesundes Gewebe gleichermaßen effizient angreifen würde. Ideal wäre eine Kombination, die die Tumorzellen synergistisch schwächt, aber bei gesunden Fibroblasten ein weniger effektives Ergebnis hätte. Das wäre hier z. B bei der Kombination von 4 Gy und 50 µg/ml ZnO NP am ehesten gegeben, da diese auf die Zelllinie A549 synergistisch und auf die anderen beiden Zelltypen nur additiv wirkte. Vorausgegangene Studien (72,134–136) ließen eine derartige selektive Toxizität erwarten, die bei gleicher Behandlung vor allem die Tumorzellen angreifen sollte, das gesunde Gewebe jedoch nicht im gleichem Ausmaß. Eine derartig wirksame Behandlungskombination ließ sich jedoch mit den hier durchgeführten Experimenten nicht herausfinden. Trotzdem lässt der Vergleich der Ergebnisse aus CFAs und mikroskopischen Aufnahmen für HNSCCUM-02T (Abbildung 10 und Abbildung 20) und Fibroblasten (Abbildung 12 und Abbildung 21), wo Konzentrationen von NP unter 100 µg/ml keine bis nur eine sehr schwache Wirkung zeigten, darauf schließen, dass sich eine Therapie mit ausschließlich ZnO NP bei HNSCC als sinnvoll erweisen könnte, da die NP auf diese Tumorzellen in beiden Versuchsformen eine deutlich größere Wirkung zeigten, wohingegen die FB von den NP deutlich schwächer angegriffen waren. Zur Untersuchung, weshalb die Fibroblasten so unterschiedliche Reaktionen im CFA und bei den mikroskopischen Aufnahmen zeigten wird es in Zukunft weiterführender Versuche bedürfen. Dafür könnte man zur besseren Vergleichbarkeit für die Bestrahlung im CFA die Zellen auf den Zellkulturschalen belassen.

5.4 Ausblick auf mögliche therapeutische Anwendungen

Wie bisher gezeigt wurde, hat die Kombination von Behandlung mit ZnO NP und Bestrahlung Potential als mögliche Behandlungskombination in der Tumortherapie. Es wird jedoch in weiteren Experimenten nötig sein, die Anwendung von NP in feiner abgestuften Konzentrationen vorzunehmen und an die verschiedenen Tumortypen anzupassen, da sich aus den Ergebnissen zeigte, dass Tumorzelllinien sehr unterschiedlich auf die gleichen Behandlungen reagieren können. Vor allem bei HNSCC muss sich noch herausstellen, ob man nicht NP als alleinige Behandlung einsetzen oder in Kombination mit Bestrahlung zumindest eine geringe Bestrahlungsdosis einsetzen sollte.

Ebenfalls sollten auch andere vielversprechende Ansätze in Zusammenhang mit NP-Behandlung weiterverfolgt werden, wie beispielsweise der photo- oder sonokatalytischen Effekt (73), wo die Kombination mit NIR-Strahlung bei der photodynamischen Therapie mittlerweile schon weit genug ins Gewebe eindringen, aber den Tumor noch nicht gänzlich beseitigen kann (145). Auch Veränderungen der ZnO NP selbst (z. B. Dotierungen) wurden schon in Kombination mit verschiedenen Strahlungsarten (UV-, Röntgen- und γ-Strahlung) untersucht, und der resultierende Therapieeffekt war dabei bei Verwendung von Röntgen- und γ-Strahlung auch in tiefer gelegenen Gewebebereichen erkennbar, womit diese Kombination nicht nur für oberflächliche Tumore zum Einsatz kommen könnte (142).

Bei der Anwendung von NP im Körper stellt sich außerdem immer die Frage nach dem möglichst zielgerichteten Transport zum Tumorgewebe. Man hielt für längere Zeit den passiven Weg, der auf dem EPR-Effekt (149,150) basiert (siehe Kapitel 2.2.3), für eine auch klinisch durchführbare Option, wobei sich aber Unterschiede zwischen den *in-vivo*-Versuchen und der Durchführung am Menschen zeigten (151). Eine andere Alternative ist die aktive Ansteuerung des Tumors (*active targeting*, (153)), wobei hier aber auch das Problem besteht, dass oft die Komplexität des Systems nicht anhand von *in-vitro*-Versuchen dargestellt werden kann (154) und sich die Systeme von Tieren auch hier bei *in-vivo*-Versuchen oft von dem des menschlichen Körpers unterscheiden (151). Ebenso muss die Tumorheterogenität (siehe Kapitel 2.1.1) auch innerhalb eines Tumortyps immer in Betracht gezogen werden, ebenso wie die unterschiedlichen Wirkungen der gleichen Behandlung auf verschiedene Tumortypen, was auch in

dieser Arbeit anhand der unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T gezeigt wurde. Des Weiteren muss man bei der Anwendung von NP immer gleiche Eigenschaften garantieren können, da besonders im Nanobereich jede kleine Veränderung schon Auswirkungen auf die Experimente bzw. die Behandlung haben kann. Deshalb sind genaue Qualitätskontrollen wichtig, die die Stabilität der einzelnen Chargen (Chargenkonstanz) gewährleisten (157).

Für die Weiterverfolgung der Kombination von ZnO NP und Bestrahlung sollten demnach bei künftigen *in-vitro*-Experimenten noch genauere Abstufungen bei der NP-Konzentration getroffen werden und die unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien in Betracht gezogen werden. Außerdem muss die zielgerichtete Einbringung der NP nur in das Tumorgewebe funktionieren, um bei der Anwendung im menschlichen Körper Toxizität auf gesundes Gewebe zu minimieren, zumal hier in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass therapeutisch wirksame NP-Konzentrationen wohl immer auch einen gewissen Effekt auf das gesunde Gewebe haben werden.

6 Zusammenfassung

Immer mehr Disziplinen machen sich die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln zunutze. Auch in der Medizin forscht man zunehmend an verschiedenen Möglichkeiten, sie sich entweder alleine oder in Kombination mit herkömmlichen Behandlungsmethoden zunutze zu machen. Dies gilt in besonderem Maße in der Tumorbehandlung, bei der man bei manchen Tumortypen trotz immer weiterführenden Erkenntnissen auf der molekularen Ebene noch immer nicht von einer bedeutenden Verbesserung der Mortalitätsraten in der Therapie sprechen kann. Auch bei den Plattenepithelkarzinomen (HNSCC) macht gerade die Heterogenität auch innerhalb eines Tumortyps eine genaue Vorhersage des Ansprechens auf die Behandlung und damit deren Erfolg sehr schwierig. Auch die Tatsache, dass diese Tumore häufig Resistenzen gegen die Bestrahlung ausbilden, ließ die Forschung nach neuen Möglichkeiten neben der klassischen Behandlung mit Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung suchen. Aus diesem Grund hat sich diese Arbeit mit der Kombination von Zinkoxid-Nanopartikeln (ZnO NP) und Bestrahlung (γ-Strahlung) und deren Wirkung auf die Tumorzelllinien A549 und HNSCCUM-02T und im Vergleich dazu auf gesunde, primäre Fibroblasten beschäftigt. Die Versuche wurden *in vitro* in Zellkultur anhand eines Koloniebildungsassays (CFA) durchgeführt, aus dem dann die Überlebensfraktion (*surviving fraction,* SF) bestimmt wurde. Ergänzend dazu wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht, um morphologische Veränderungen und die Einflussnahme der Behandlungsregimente auf die Proliferation der unterschiedlichen Zelltypen einschätzen zu können. Eine zu testende Hypothese war es hierbei, ob unter einer bestimmten Dosierung der beiden Behandlungskomponenten die Fibroblasten im Vergleich zu den Tumorzellen einen geringeren Schaden davontragen würden. Außerdem wurde untersucht, ob die beiden Komponenten in Kombination eine Wirkung zeigen, die über den additiven Effekt hinausgeht.

Aus den Ergebnissen ging deutlich hervor, dass die SF bei allen getesteten Zelltypen in Abhängigkeit von ZnO NP-Konzentration und Bestrahlungsdosis abnahm. Des Weiteren zeigten die beiden Tumorzelllinien häufig unterschiedliche Reaktionen auf die jeweils gleichen Behandlungskombinationen, wobei man erkennen konnte, dass die untersuchte

HNSCC-Linie deutlich empfindlicher auf die ZnO NP reagierte als die Tumorzelllinie A549. Daran lässt sich erkennen, dass Tumore unterschiedlich auf die gleiche Behandlung reagieren können, somit auch beim Einsatz von NP die Konzentrationen dementsprechend angepasst werden müssen. Die Fibroblasten verhielten sich im CFA vergleichbar mit der Tumorzelllinie A549 und zeigten sich bei keiner Behandlungskombination widerstandsfähiger als die Tumorzelllinien. Im Gegensatz dazu bot sich nach den Experimenten für die oben angesprochenen lichtmikroskopischen Aufnahmen das entgegengesetzte Bild, hier zeigten sie sich als der am wenigsten empfindliche der getesteten Zelltypen. Bei diesen Experimenten erfolgte die Behandlung der Zellen mit ZnO NP sowie deren Bestrahlung, während die Zellen noch an der Zellkulturschale adhärierten. Die unterschiedlichen Beobachtungen aus den CFAs und den lichtmikroskopischen Aufnahmen lassen sich eventuell mit der Bestrahlung im abgelösten Zustand bei den CFAs erklären. Nach diesem Ablösen waren die Fibroblasten womöglich nicht mehr dazu in der Lage, im gleichen Maße zu proliferieren wie nach Behandlung im adhärierten Zustand.

Abschließend wurden alle getesteten Behandlungskombinationen anhand der resultierenden SF auf mögliche synergistische, additive oder antagonistische Effekte hin untersucht. Hier zeigte sich, dass die meisten Reaktionen der Zelllinie A549 auf einen synergistischen oder additiven Effekt der Behandlungskomponenten hinwiesen. Im Vergleich dazu zeigten die Fibroblasten nur eine einzige synergistische Kombination und die Linie HNSCCUM-02T gar keine synergistischen, sondern nur wenige additive und ansonsten antagonistische Reaktionen. Letztere war ebenso derjenige Zelltyp, der am empfindlichsten auf die ZnO NP reagierte, weswegen sich vermuten lässt, dass neben der starken Reaktion auf die NP die Bestrahlung womöglich nur einen vernachlässigbar geringen Effekt zeigen konnte. Außerdem fiel eine bestimmte Kombination (2 Gy und 80 µg/ml ZnO NP) als die einzige auf, welche auf die Tumorzelllinien einen synergistischen (A549) oder additiven Effekt (HNSCCUM-02T) hatte. Für die gleiche Behandlungskombination ließ sich bei den Fibroblasten ebenfalls ein synergistischer Effekt beobachten, was nahelegt, dass das gesunde Gewebe hier ebenfalls Schaden davontragen würde.

Diese Arbeit zeigt, dass ZnO NP in Kombination mit Radiatio eine toxische Wirkung sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesunde Zellen ausüben. Jedoch bleibt die Frage weiterhin offen, ob es Behandlungskombinationen gibt, die

speziell für Plattenepithelkarzinomzellen toxisch sind, das umliegende gesunde Gewebe aber möglichst wenig beschädigen.

7 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin; 2016.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Krebs in Deutschland 2013/2014. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin; 2017.
3. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. 106–108 p.
4. Shaw R, Beasley N. Aetiology and risk factors for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. J Laryngol Otol. 2016;130(S2):S9–12.
5. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. J Natl Cancer Inst. 2007;99(10):777–89.
6. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Eisele DW, editor. Head Neck. 2013 May;35(5):747–55.
7. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. J Natl Cancer Inst. 2000;92(9):709–20.
8. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek LP. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: A case for multifactor disease. J Oncol. 2012;2012.
9. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 2010;363(1):24–35.
10. Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, et al. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal

intraepithelial neoplasia and anogenital warts: Randomised controlled trial. BMJ. 2010;341(7766):9.

11. Robert Koch-Institut. Ständige Impfkommission: Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut. Epidemiol Bull. 2019;(34):313–64.
12. Farsi NJ, Rousseau MC, Schlecht N, Castonguay G, Allison P, Nguyen-Tan PF, et al. Aetiological heterogeneity of head and neck squamous cell carcinomas: The role of human papillomavirus infections, smoking and alcohol. Carcinogenesis. 2017;38(12):1188–95.
13. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: Results of two multicentric case-control studies. Am J Epidemiol. 2007;166(10):1159–73.
14. Piemonte E, Lazos J, Belardinelli P, Secchi D, Brunotto M, Lanfranchi-Tizeira H. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. Med Oral Patol Oral y Cir Bucal. 2018;23(2):e151–60.
15. Singhvi HR, Malik A, Chaturvedi P. The role of chronic mucosal trauma in oral cancer: A review of literature. Indian J Med Paediatr Oncol. 2017;38(1):44–50.
16. Ho PS, Ko YC, Yang YHC, Shieh TY, Tsai CC. The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: An endemic betel quid chewing area. J Oral Pathol Med. 2002;31(4):213–9.
17. Chuang SC, Jenab M, Heck JE, Bosetti C, Talamini R, Matsuo K, et al. Diet and the risk of head and neck cancer: A pooled analysis in the INHANCE consortium. Cancer Causes Control. 2012;23(1):69–88.
18. Bravi F, Bosetti C, Filomeno M, Levi F, Garavello W, Galimberti S, et al. Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. Br J Cancer. 2013;109(11):2904–10.
19. Butler C, Lee YCA, Li S, Li Q, Chen CJ, Hsu WL, et al. Diet and the risk of head-and-neck cancer among never-smokers and smokers in a Chinese population. Cancer Epidemiol. 2017;46:20–6.
20. Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2017 Oct 19;372(1732):20160270.
21. Guidry JT, Birdwell CE, Scott RS. Epstein–Barr virus in the pathogenesis

of oral cancers. Vol. 24, Oral Diseases. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 497–508.

22. Wojciechowska J, Krajewski W, Bolanowski M, Krecicki T, Zatoński T. Diabetes and Cancer: A Review of Current Knowledge. Vol. 124, Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes. Georg Thieme Verlag; 2016. p. 263–75.
23. Rêgo DF, Pavan LMC, Elias ST, De Luca Canto G, Guerra ENS. Effects of metformin on head and neck cancer: A systematic review. Vol. 51, Oral Oncology. Elsevier Ltd; 2015. p. 416–22.
24. De Visscher JGAM, Van Der Waal I. Etiology of cancer of the lip: A review. Int J Oral Maxillofac Surg. 1998;27(3):199–203.
25. Weinberg RA. Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. Cancer Res. 1989;49(14):3713–21.
26. Hiddeman W, Bartram CR. Die Onkologie. 2nd ed. Hiddemann W, Bartram CR, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
27. Sedlacek H-H. Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen. Berlin: De Gruyter; 2013.
28. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. Cell Death Dis. 2019;10(8):540.
29. Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. Cell Death Dis. 2014;5.
30. Jou A, Hess J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. Oncol Res Treat. 2017;40(6):328–32.
31. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2015;51(7):643–51.
32. Brieger J, Jacob R, Riazimand HS, Essig E, Heinrich UR, Bittinger F, et al. Chromosomal aberrations in premalignant and malignant squamous epithelium. Cancer Genet Cytogenet. 2003;144(2):148–55.
33. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(5):2420–4.

34. Lane DP, Crawford L V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. Nature. 1979 Mar;278(5701):261–3.
35. Crawford L V., Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. Detection of a common feature in several human tumor cell lines: A 53,000-dalton protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(1 II):41–5.
36. Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. J Virol. 1979;31(2):472–83.
37. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformend cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell. 1979;17(1):43–52.
38. Melero JAA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. Virology. 1979;93(2):466–80.
39. Smith AE, Smith R, Paucha E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. Cell. 1979;18(2):335–46.
40. Baker SJ, Vogelstein B. P53: a Tumor Suppressor Hiding in Plain Sight. J Mol Cell Biol. 2019;11(7):536–8.
41. Hussain SP, Harris CC. p53 biological network: At the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. J Nippon Med Sch. 2006;73(2):54–64.
42. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. Oral Oncol. 2009;45(4–5):335–9.
43. Mineta H, Borg Å, Dictor M, Wahlberg P, Åkervall J, Wennerberg J. p53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 1998 Oct;78(8):1084–90.
44. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated Levels of Transforming Growth Factor a and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. Cancer Res. 1993;53(15):3579–84.
45. Agulnik M. New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Med Oncol. 2012;29(4):2481–91.

46. Ahmad P, Sana J, Slavik M, Slampa P, Smilek P, Slaby O. MicroRNAs involvement in radioresistance of head and neck cancer. Dis Markers. 2017;2017.
47. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2018;18(5):269–82.
48. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. Cancer. 1953;6(5):963–8.
49. Gabusi A, Morandi L, Asioli S, Foschini MP. Oral field cancerization: History and future perspectives. Pathologica. 2017;109(1):60–5.
50. Califano J, Van Der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. Cancer Res. 1996;56(11):2488–92.
51. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: A systematic review. Oral Oncol. 2003;39(8):770–80.
52. Ganesh D, Sreenivasan P, Ohman J, Wallström M, Braz-Silva PH, Giglio D, et al. Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. Anticancer Res. 2018;38(6):3223–9.
53. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter’s concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. Cancer Res. 2003;63(8):1727–30.
54. Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. Ann Oncol. 2005;16(SUPPL. 6):7–12.
55. Pignon JP, Maître A le, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. Radiother Oncol. 2009;92(1):4–14.
56. Karabajakian A, Toussaint P, Neidhardt E-M, Paulus V, Saintigny P, Fayette J. Chemotherapy for recurrent/metastatic head and neck cancers. Anticancer Drugs. 2017 Apr;28(4):357–61.
57. Argiris A, Harrington KJ, Tahara M, Schulten J, Chomette P, Castro AF, et al. Evidence-based treatment options in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Front Oncol. 2017;7(MAY):1–14.
58. Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpati G, Cella L, Giuliano M, Caponigro F, et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma:

Biological bases and therapeutic implications. Myers JN, editor. Head Neck. 2015 May;37(5):763–70.

59. Storz G, Imlayt JA. Oxidative stress. Curr Opin Microbiol. 1999 Apr;2(2):188–94.
60. Stępień K, Ostrowski RP, Matyja E. Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours. Med Oncol. 2016;33(9):1–9.
61. dkg-web Redaktion i.V. Christmann D. Deutsche Krebsgesellschaft [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 3]. Available from: https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/therapie.html
62. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. N Engl J Med. 2008;359(11):1116–27.
63. Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, Cronin KA, Ma J, Ryerson AB, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. J Natl Cancer Inst. 2017;109(9):1–22.
64. Feynman R. “There’s plenty of room at the bottom” Reprint from speech given at annual meeting of the American Physical Society. Eng Sci. 1960;23:22–36.
65. Sanchez F, Sobolev K. Nanotechnology in concrete - A review. Constr Build Mater. 2010;24(11):2060–71.
66. Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. Adv Colloid Interface Sci. 2017;249:37–52.
67. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. Biomed Pharmacother. 2003;57(9):399–411.
68. Janotti A, Van De Walle CG. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. Reports Prog Phys. 2009;72(12):1–29.
69. Kolodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. Zinc oxide-from synthesis to application: A review. Materials (Basel). 2014 Apr 9;7(4):2833–81.
70. Özgür Ü, Alivov YI, Liu C, Teke A, Reshchikov MA, Doğan S, et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices. J Appl Phys. 2005;98(4):1–103.
71. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide

nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert Opin Drug Deliv. 2010;7(9):1063–77.

72. Wiesmann N, Kluenker M, Demuth P, Brenner W, Tremel W, Brieger J. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. J Trace Elem Med Biol. 2019;51:226–34.
73. Bogdan J, Pławińska-Czarnak J, Zarzyńska J. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review. Nanoscale Res Lett. 2017 Dec;12(1):225.
74. Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WCW. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. Nano Lett. 2009;9(5):1909–15.
75. Zuckerman JE, Choi CHJ, Han H, Davis ME. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(8):3137–42.
76. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. Adv Mater. 2009;21(4):419–24.
77. Lu F, Wu SH, Hung Y, Mou CY. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. Small. 2009;5(12):1408–13.
78. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. Nat Nanotechnol. 2008;3(3):145–50.
79. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. Int J Nanomedicine. 2014;9(SUPPL.1):51–63.
80. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. Nanomedicine. 2016;11(6):673–92.
81. Jiang X, Rocker C, Hafner M, Brandholt S, Dorlich RM, Nienhaus GU. Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells. ACS Nano. 2010;4(11):6787–97.
82. Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR Spectroelectrochemistry. ACS Nano. 2012 Feb 28;6(2):1251–9.
83. Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. Environ Sci Technol.

2006;40(14):4353–9.

84. Chen LQ, Fang L, Ling J, Ding CZ, Kang B, Huang CZ. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. Chem Res Toxicol. 2015;28(3):501–9.
85. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. Biomaterials. 2010;31(13):3657–66.
86. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nano-Micro Lett. 2015;7(3):219–42.
87. Song Z, Kelf TA, Sanchez WH, Roberts MS, Rička J, Frenz M, et al. Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport. Biomed Opt Express. 2011;2(12):3321–33.
88. Duncan T V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. J Colloid Interface Sci. 2011;363(1):1–24.
89. Gudkov S V., Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. Front Phys. 2021;9(March):1–12.
90. Wang S, Wu J, Yang H, Liu X, Huang Q, Lu Z. Antibacterial activity and mechanism of Ag/ZnO nanocomposite against anaerobic oral pathogen Streptococcus mutans. J Mater Sci Mater Med. 2017;28(1):1–8.
91. Sevinç BA, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2010 Jul;94B(1):22–31.
92. Wiesmann N, Tremel W, Brieger J. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. J Mater Chem B. 2020;8(23):4973–89.
93. Jin S, Jin H-E. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications: From Physicochemical Characteristics to Pharmacological Aspects. Nanomaterials. 2021 Jan 20;11(2):263.
94. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J Nanoparticle Res. 2007;9(3):479–89.

95. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - An antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater. 2008;9(3):035004 (7pp).
96. Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir. 2002 Aug 20;18(17):6679–86.
97. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Lett. 2006 Apr;6(4):866–70.
98. Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger MA. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp. 2014 Sep 5;457(1):263–74.
99. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions. Water Res. 2006 Nov;40(19):3527–32.
100. Huang Z, Zheng X, Yan D, Yin G, Liao X, Kang Y, et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. Langmuir. 2008 Apr 15;24(8):4140–4.
101. Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. ACS Nano. 2008 Oct;2(10):2121–34.
102. Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. Int J Inorg Mater. 2001;3(7):643–6.
103. Sawai J, Shoji S, Igarashi H, Hashimoto A, Kokugan T, Shimizu M, et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. J Ferment Bioeng. 1998 Jan;86(5):521–2.
104. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids-A potential antibacterial agent. Prog Nat Sci. 2008;18(8):939–44.
105. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir. 2011 Apr 5;27(7):4020–8.
106. Hirota K, Sugimoto M, Kato M, Tsukagoshi K, Tanigawa T, Sugimoto H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. Ceram Int. 2010 Mar;36(2):497–506.

107. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 2008;279(1):71–6.
108. Adams CP, Walker KA, Obare SO, Docherty KM. Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles. PLoS One. 2014;9(1):e85981.
109. Talebian N, Amininezhad SM, Doudi M. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. J Photochem Photobiol B Biol. 2013;120:66–73.
110. Ann LC, Mahmud S, Bakhori SKM, Sirelkhatim A, Mohamad D, Hasan H, et al. Effect of surface modification and UVA photoactivation on antibacterial bioactivity of zinc oxide powder. Appl Surf Sci. 2014;292:405–12.
111. Sharma D, Rajput J, Kaith BS, Kaur M, Sharma S. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. Thin Solid Films. 2010;519(3):1224–9.
112. He L, Liu Y, Mustapha A, Lin M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against Botrytis cinerea and Penicillium expansum. Microbiol Res. 2011;166(3):207–15.
113. Kairyte K, Kadys A, Luksiene Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. J Photochem Photobiol B Biol. 2013;128:78–84.
114. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury. Nanotechnology. 2011 Feb;22(10):105101.
115. Jiang J, Pi J, Cai J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. Bioinorg Chem Appl. 2018;2018:1–18.
116. Vandebriel RJ, De Jong WH. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. Nanotechnol Sci Appl. 2012 Aug 15;5(1):61–71.
117. Wang L, Wang L, Ding W, Zhang F. Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. J Nanosci Nanotechnol. 2010 Dec 1;10(12):8617–24.
118. Li C-H, Shen C-C, Cheng Y-W, Huang S-H, Wu C-C, Kao C-C, et al. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. Nanotoxicology. 2012 Nov 27;6(7):746–56.

119. Warheit DB, Sayes CM, Reed KL. Nanoscale and fine zinc oxide particles: Can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures? Environ Sci Technol. 2009;43(20):7939–45.
120. Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of Nanoparticles Across the Rat Nasal Mucosa. J Drug Target. 2001 Jan 8;9(4):267–79.
121. George S, Pokhrel S, Xia T, Gilbert B, Ji Z, Schowalter M, et al. Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping. ACS Nano. 2010;4(1):15–29.
122. Hsiao IL, Huang YJ. Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. Chem Res Toxicol. 2011;24(3):303–13.
123. Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, et al. Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. Adv Mater. 2010;22(24):2601–27.
124. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, et al. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. Toxicol Vitr. 2011;25(3):657–63.
125. Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO2 nanoparticles toward human lung epithelial cells. Sci Total Environ. 2011;409(7):1219–28.
126. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Part Fibre Toxicol. 2011;8:10:1–16.
127. Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, et al. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. Chem Biol Interact. 2012;198(1–3):29–37.
128. Grasset F, Saito N, Li D, Park D, Sakaguchi I, Ohashi N, et al. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. J Alloys Compd. 2003;360(1–2):298–311.
129. Greenwald RB, Choe YH, McGuire J, Conover CD. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55(2):217–50.
130. Luo M, Shen C, Feltis BN, Martin LL, Hughes AE, Wright PFA, et al. Reducing ZnO nanoparticle cytotoxicity by surface modification. Nanoscale. 2014;6(11):5791–8.
131. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. Annu Rev

Biochem. 2009;78(1):857–902.

132. Hong R, Pan T, Qian J, Li H. Synthesis and surface modification of ZnO nanoparticles. Chem Eng J. 2006;119(2–3):71–81.
133. Yin H, Casey PS, McCall MJ. Surface Modifications of ZnO Nanoparticles and Their Cytotoxicity. J Nanosci Nanotechnol. 2010 Nov 1;10(11):7565–70.
134. Hanley C, Layne J, Punnoose A, Reddy KM, Coombs I, Coombs A, et al. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. Nanotechnology. 2008 Jul 23;19(29):295103.
135. Ostrovsky S, Kazimirsky G, Gedanken A, Brodie C. Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells. Nano Res. 2009;2(11):882–90.
136. Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2011 Apr 1;7(2):184–92.
137. Shandiz SAS, Sharifian F, Behboodi S, Ghodratpour F, Baghbani-Arani F. Evaluation of metastasis suppressor genes expression and in vitro anti-cancer effects of zinc oxide nanoparticles in human breast cancer cell lines mcf-7 and t47d. Avicenna J Med Biotechnol. 2021;13(1):9–14.
138. Taccola L, Raffa V, Riggio C, Vittorio O, Iorio MC, Vanacore R, et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. Int J Nanomedicine. 2011;6:1129–40.
139. Khan MJ, Ahmad A, Khan MA, Siddiqui S. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma Cells Through Reactive Oxygen Species and DNA Degradation. Biol Trace Elem Res. 2021;199(6):2172–81.
140. Generalov R, Kuan WB, Chen W, Kristensen S, Juzenas P. Radiosensitizing effect of zinc oxide and silica nanocomposites on cancer cells. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2015 May;129:79–86.
141. Wiesmann N, Gieringer R, Viel M, Eckrich J, Tremel W, Brieger J. Zinc oxide nanoparticles can intervene in radiation-induced senescence and eradicate residual tumor cells. Cancers (Basel). 2021;13(12):1–21.
142. Ghaemi B, Mashinchian O, Mousavi T, Karimi R, Kharrazi S, Amani A. Harnessing the Cancer Radiation Therapy by Lanthanide-Doped Zinc Oxide Based Theranostic Nanoparticles. ACS Appl Mater Interfaces.

2016;8(5):3123–34.

143. Sayed HM, Said MM, Morcos NYS, El Gawish MA, Ismail AFM. Antitumor and Radiosensitizing Effects of Zinc Oxide-Caffeic Acid Nanoparticles against Solid Ehrlich Carcinoma in Female Mice. Integr Cancer Ther. 2021;20:1–22.
144. Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kubota Y, et al. Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO2-polyethylene glycol compound: Evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids in vitro. Photochem Photobiol. 2010;86(4):964–71.
145. Lucky SS, Muhammad Idris N, Li Z, Huang K, Soo KC, Zhang Y. Titania coated upconversion nanoparticles for near-infrared light triggered photodynamic therapy. ACS Nano. 2015 Jan 27;9(1):191–205.
146. Harada Y, Ogawa K, Irie Y, Endo H, Feril LB, Uemura T, et al. Ultrasound activation of TiO2 in melanoma tumors. J Control Release. 2011 Jan 20;149(2):190–5.
147. Moosavi Nejad S, Takahashi H, Hosseini H, Watanabe A, Endo H, Narihira K, et al. Acute effects of sono-activated photocatalytic titanium dioxide nanoparticles on oral squamous cell carcinoma. Ultrason Sonochem. 2016 Sep 1;32:95–101.
148. Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kudo N, et al. Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO2-polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. Ultrason Sonochem. 2011;18(5):1197–204.
149. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. J Control Release. 2010;148(2):135–46.
150. Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. Cancer Res. 1986;46(8):6387–92.
151. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? J Control Release. 2016;244:108–21.
152. Stylianopoulos T, Jain RK. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. Vol. 11, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.

Elsevier Inc.; 2015. p. 1893–907.

153. Bi Y, Hao F, Yan G, Teng L, J. Lee R, Xie J. Actively Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Tumor. Curr Drug Metab. 2016;17(8):763–82.
154. Awasthi R, Roseblade A, Hansbro PM, Rathbone MJ, Dua K, Bebawy M. Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. Curr Drug Targets. 2018;19(14):1696–709.
155. Welkoborsky HJ, Jacob R, Riazimand SH, Bernauer HS, Mann WJ. Molecular biologic characteristics of seven new cell lines of squamous cell carcinomas of the head and neck and comparison to fresh tumor tissue. Oncology. 2003;65(1):60–71.
156. Chou T-C, Martin N. CompuSyn software for drug combinations and for general dose-effect analysis, and user's guide. Paramus, NJ: ComboSyn, Inc.; 2007.
157. Peltonen L. Practical guidelines for the characterization and quality control of pure drug nanoparticles and nano-cocrystals in the pharmaceutical industry. Adv Drug Deliv Rev. 2018;131:101–15.

8 Anhang

Hier im Anhang werden alle nicht im Ergebnisteil gezeigten Daten in der Reihenfolge der Erwähnung im Haupttext gezeigt. Auf die zusätzlichen Daten wird im Text dementsprechend auch Bezug genommen.

Tabelle 10, zugehörig zu Tabelle 8

Tabelle 10: Überlebensfraktion aller Zelltypen bei allen getesteten Behandlungen (einzelne Rohwerte)

Die Tabelle zeigt die einzelnen SFs (Überlebensfraktionen, surviving fractions) aller Versuchsreihen und die aus ihnen errechneten Mittelwerte (MW) aller getesteten Zelltypen bei allen Behandlungskombinationen mit Standardabweichung (SD) in Klammern (vergleiche Tabelle 8 in Kapitel 4.2). Alle Werte wurden auf vier Nachkommastellen gerundet. Bei den Fibroblasten, die ähnlich empfindlich auf diese Behandlungen reagierten wie HNSCCUM-02T, wurde kein Versuch mit 100 µg/ml ZnO NP durchgeführt. Auch die Bestrahlungsdosis von 8 Gy wurde hier nur ohne NP getestet. Für eine bessere Lesbarkeit ist die Tabelle auf der nächsten Seite dargestellt.

Zell-linie		0 Gy		2 Gy		4 Gy		8 Gy	
		SF	MW (± SD)	SF	MW (± SD)	SF	MW (± SD)	SF	MW (± SD)
A549[1)]	0 µg/ml	1,0000	1,0000 (± 0,0000)	0,4899	0,4287 (± 0,0389)	0,2007	0,1199 (± 0,0473)	0,0042	0,0036 (± 0,0004)
		1,0000		0,4324		0,1055		0,0037	
		1,0000		0,4060		0,0881		0,0034	
		1,0000		0,3867		0,0855		0,0030	
	20 µg/ml	0,8941	0,9317 (± 0,1478)	0,4540	0,4673 (± 0,2559)	0,1656	0,1632 (± 0,1141)	0,0056	0,0031 (± 0,0018)
		1,1456		0,8875		0,3485		0,0041	
		0,7326		0,2290		0,0609		0,0013	
		0,9543		0,2986		0,0779		0,0016	
	50 µg/ml	0,8436	0,6170 (± 0,1430)	0,3913	0,2013 (± 0,1110)	0,0595	0,0310 (± 0,0169)	0,0022	0,0006 (± 0,0009)
		0,4519		0,1116		0,0174		0,0001	
		0,5940		0,1432		0,0275		0,0003	
		0,5784		0,1592		0,0193		0,0000	
	80 µg/ml	0,4642	0,2798 (± 0,1079)	0,1850	0,0702 (± 0,0664)	0,0364	0,0136 (± 0,0132)	0,0004	0,0001 (± 0,0002)
		0,1957		0,0296		0,0062		0,0000	
		0,2138		0,0376		0,0062		0,0000	
		0,2457		0,0285		0,0055		0,0000	
	100 µg/ml	0,4240	0,2800 (± 0,1170)	0,1576	0,0721 (± 0,0522)	0,0249	0,0108 (± 0,0083)	0,0006	0,0002 (± 0,0003)
		0,1092		0,0221		0,0041		0,0000	
		0,2461		0,0394		0,0061		0,0000	
		0,3408		0,0695		0,0079		0,0000	
HNSCCUM-02T[1)]	0 µg/ml	1,0000	1,0000 (± 0,0000)	0,6003	0,6350 (± 0,2476)	0,3403	0,3244 (± 0,0484)	0,0394	0,0250 (± 0,0133)
		1,0000		0,2681		0,2452		0,0070	
		1,0000		0,9558		0,3767		0,0360	
		1,0000		0,7156		0,3356		0,0177	
	20 µg/ml	0,8557	0,8027 (± 0,0419)	0,5250	0,4844 (± 0,0432)	0,2642	0,2558 (± 0,0572)	0,0327	0,0264 (± 0,0118)
		0,8227		0,4195		0,1607		0,0065	
		0,7422		0,5222		0,3096		0,0369	
		0,7901		0,4707		0,2888		0,0295	
	50 µg/ml	0,3150	0,0808 (± 0,1352)	0,1682	0,0424 (± 0,0726)	0,0634	0,0159 (± 0,0274)	0,0036	0,0009 (± 0,0015)
		0,0078		0,0012		0,0000		0,0000	
		0,0002		0,0002		0,0000		0,0000	
		0,0004		0,0002		0,0003		0,0000	
	80 µg/ml	0,0048	0,0018 (± 0,0018)	0,0007	0,0003 (± 0,0002)	0,0002	0,0001 (± 0,0001)	0,0000	0,0000 (± 0,0000)
		0,0016		0,0002		0,0001		0,0000	
		0,0004		0,0001		0,0000		0,0000	
		0,0003		0,0003		0,0002		0,0000	
	100 µg/ml	0,0014	0,0006 (± 0,0005)	0,0003	0,0002 (± 0,0001)	0,0002	0,0001 (± 0,0001)	0,0000	0,0000 (± 0,0000)
		0,0002		0,0001		0,0001		0,0000	
		0,0001		0,0002		0,0000		0,0000	
		0,0004		0,0001		0,0000		0,0000	
Fibroblasten[2)]	0 µg/ml	1,0000	1,0000 (± 0,0000)	0,3890	0,2675 (± 0,1199)	0,0755	0,0648 (± 0,0328)	0,0003	0,0007 (± 0,0007)
		1,0000		0,1042		0,0204		0,0000	
		1,0000		0,3091		0,0984		0,0016	
	20 µg/ml	0,8272	0,7944 (± 0,0401)	0,3467	0,2760 (± 0,1047)	0,0717	0,0755 (± 0,0521)	-	
		0,8182		0,1280		0,0136			
		0,7379		0,3532		0,1411			
	50 µg/ml	0,3491	0,4818 (± 0,1424)	0,1084	0,1058 (± 0,0173)	0,0187	0,0179 (± 0,0104)	-	
		0,6793		0,0834		0,0047			
		0,4169		0,1255		0,0302			
	80 µg/ml	0,0370	0,0336 (± 0,0226)	0,0042	0,0040 (± 0,0031)	0,0002	0,0001 (± 0,0001)	-	
		0,0044		0,0000		0,0000			
		0,0595		0,0076		0,0001			
	100 µg/ml	-		-		-		-	

1) N = 4; 2) N = 3; SF = Überlebensfraktion, surviving fraction; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung, standard deviation

Abbildung 22, erwähnt in Kapitel 5.2

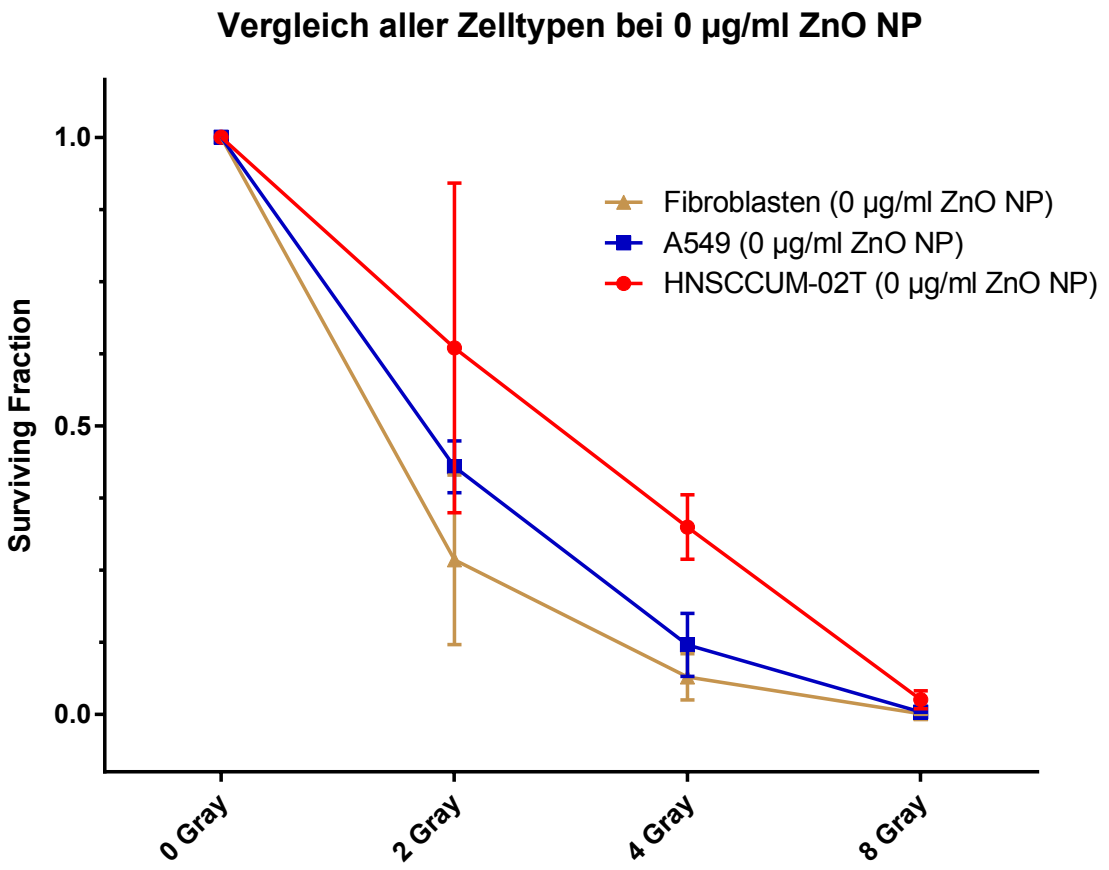


Abbildung 22: Überlebensfraktionen von allen drei Zelltypen bei einer ZnO-NP-Konzentration von 0 µg/ml und allen getesteten Bestrahlungsdosen

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD aus bei den Tumorzelllinien vier (N = 4) und bei den Fibroblasten drei (N=3) voneinander unabhängigen Experimenten. Die Strahlungsdosis ist auf der x-Achse aufgetragen, die SF nicht-logarithmisch auf der y-Achse. Farben und Symbole für die verschiedenen Zelltypen sind der Legende oben rechts zu entnehmen. Für signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen unterschiedlicher Zelltypen siehe Abbildung 14, in der die SF logarithmisch aufgetragen ist.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die eine Vollendung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle sei ganz herzlich gedankt, in dessen AG ich die Möglichkeit hatte, dieses spannende Thema zu bearbeiten. Ich möchte mich herzlich für die sehr gute Betreuung bedanken, die hilfreichen Ratschläge und die stets offene Tür.

Ebenso gilt mein großer Dank , die mir immer sowohl bei methodischen als auch bei inhaltlichen Fragen geduldig zur Seite gestanden ist. Selbst dann, wenn ihre eigene Zeit knapp bemessen war, konnte ich auf ihre konstruktive Kritik, aber auch auf ihre Aufmunterungen und das freundliche Arbeitsklima zählen.

Auch möchte ich allen Mitarbeitern der AG , besonders , und für ihre Unterstützung danken, die auch immer ein offenes Ohr hatten und mir mit Freundlichkeit und Geduld zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Bruder und meinen Eltern bedanken. Sie haben mich stets unaufhörlich und in allen Dingen unterstützt, die ich mir vorgenommen habe. Sie waren ein maßgeblicher Faktor für das Gelingen dieser Arbeit, da sie sowohl mein Studium ermöglichten und mir auch bei Problemen mit guten Ratschlägen und nicht zuletzt beim Korrekturlesen immer geholfen haben.

An letzter, aber eigentlich wichtigster Stelle möchte ich meinem Ehemann danken, der nie an mir gezweifelt hat und mir beim Vollenden dieser Arbeit sowohl durch Korrekturlesen als auch auf emotionaler Ebene unaufhörlich zur Seite stand. Auf seine uneingeschränkte Unterstützung konnte ich mich schon während des Studiums stets verlassen, nicht zuletzt durch seine Rücksichtnahme und manchmal dringend benötigten Aufmunterungen und Umarmungen.

10 Tabellarischer Lebenslauf